

La Coloration par l'Acridine Orange en Microbiologie

APPLICATION A L'ETUDE
DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES PRODUITES
PAR LES ANTIBIOTIQUES SUR LES BACTÉRIES

THÈSE

présentée

à la FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE
de LYON

et soutenue publiquement le 19 Novembre 1965
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

PAR

Jean-Joseph FLOCH

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

né le 13 Février 1938

à TOULON (Var)



VILLEURBANNE

Imprimerie R. GAUTHIER
17, Rue Colonel-Klobb

1965

La Coloration par l'Acridine Orange en Microbiologie

APPLICATION A L'ETUDE
DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES PRODUITES
PAR LES ANTIBIOTIQUES SUR LES BACTÉRIES



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546304_0084

La Coloration par l'Acridine Orange en Microbiologie

APPLICATION A L'ETUDE
DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES PRODUITES
PAR LES ANTIBIOTIQUES SUR LES BACTÉRIES

THÈSE

présentée
à la FACULTÉ MIXTE de MÉDECINE et de PHARMACIE
de LYON

et soutenue publiquement le 19 Novembre 1965
pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

PAR

Jean-Joseph FLOCH

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

né le 13 Février 1938
à TOULON (Var)



VILLEURBANNE
Imprimerie R. GAUTHIER
17, Rue Colonel-Klobb

1965

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyens Honoraires : M. J. LEPINE, Membre de l'Institut - M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut
Doyen..... M. J.-F. CIER

Assesseurs..... MM. M. LEVRAT, L. REVOL

Professeurs Honoraires : MM. PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, GARIN, GATE,
MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET, HERMANN, ROCHET, POLLOSSON

PROFESSEURS

Clinique urologique	MM. CIBERT
Physique biologique	PONTHUS (dét. à Beyrouth)
Clinique neuro-psychiatrique et d'hygiène mentale	DECHAUME
Chimie organique et toxicologie	CHAMBON
Clinique médicale B	PAUPERT-RAVAULT
Clinique et prophylaxie cardiovasculaires	FROMENT
Clinique médicale C	CROIZAT
Clinique chirurgicale A	MALLET-GUY
Pharmacie galénique	REVOL
Clinique obstétricale	PIGEAUD
Médecine du travail	BOURRET
Clinique médicale A	LEVRAT
Hygiène et action sanitaire et sociale	SOHIER
Botanique et cryptogamie	NETIEN
Clinique chirurgicale C	BERTRAND
Chimie analytique pharmaceutique	BADINAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	DREVON
Médecine légale et déontologie	ROCHE
Parasitologie et pathologie exotique	COUDERT
Clinique d'oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie	MOUNIER-KUHN
Clinique ophtalmologique	PAUFIQUE
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	THIERS
Clinique de pneumo-phthisiologie	BRUN
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique	CREYSEL
Clinique carcinologique	DARGENT
Pathologie générale et expérimentale	GIRARD Paul

Pathologie chirurgicale	MM. PEYCELON
Anatomie pathologique	GUICHARD
Anatomie	LATARJET
Clinique médicale D	GIRARD Marcel
Pathologie médicale	VACHON
Physio-pathologie des voies respiratoires	GALY
Radiologie	PAPILLON
Clinique médicale infantile et hygiène du 1 ^{er} âge	JEUNE
Thérapeutique	GONIN
Bactériologie	MONNET
Physiologie et pathologie obstétricales	BANSSILLON
Physiologie B	CHATONNET
Clinique endocrinologique	GUINET
Clinique de chirurgie orthopédique	TRILLAT
Clinique stomatologique	FREIDEL
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles	MARION Joseph
Matière médicale et législation pharmaceutique	DORCHE
Histologie et embryologie	DUMONT Louis
Chimie	PERROT
Physiologie A	CIER J.F.
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	PERRIN J.
Clinique de chirurgie cardiaque	MICHAUD Pierre
Clinique gynécologique	MATHIEU
Biologie médicale et pharmacodynamie	FAUCON
Clinique des maladies infectieuses	BERTOYE
Biochimie appliquée	VINCENT D.
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	X...
Chimie biologique et médicale	X...
Clinique médicale infantile	X...
Clinique chirurgicale B	X...

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER
Neuro-chirurgie	MANSUY
Chimie générale et pharmaceutique	COLLET
Hygiène et climatologie	LACROIX
Clinique chirurgicale propédeutique	LIARAS

Neuro-chirurgie	LECUIRE
Médecine générale	REVOL
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André
Médecine générale	PONT Maurice
Pathologie métabolique et rénale	TRAEGER
Chimie analytique	De SOLLIERS
Médecine générale	DESPIERRES
Parasitologie	GARIN
Médecine du travail	TOLOT
Hygiène	THIVOLET

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN
Anatomie pathologique	FEROLDI
Physique biologique	MORET
Botanique et cryptogamie	ODDOUX

MAITRES DE CONFÉRENCE AGRÉGÉS TITULAIRES

Chimie biologique	MM. CREYSEL Roger
Electro-radiologie	PINET
Neuro-psychiatrie	GUYOTAT
Chirurgie générale	DESCOTES
Pathologie expérimentale	JOUVET
Physique biologique	PEYRIN
Anatomie pathologique	TOMMASI
Electro-radiologie	BUFFARD
Médecine générale et thérapeutique	LEJEUNE
Stomatologie	De MOURGUES F.
Maladies infectieuses	NAUSSAC
Chirurgie générale	REBOUILLAT
Pédiatrie	ROMAGNY
Médecine générale	DELAHAYE
Anesthésiologie	DELEUZE
Electro-radiologie diagnostique et thérapeutique	GIRAUD
Anesthésiologie	MICHEL

Chirurgie générale	MM. SOUSTELLE
Chirurgie générale	MICHOULIER
Dermatologie	COLOMB
Médecine générale	LAMBERT
—	FRIES
Pédiatrie	GILLY
Médecine générale	ROBERT
Anatomie	BOUCHET
Pédiatrie	BETHENOD
Immunologie, sérologie, hémato-	
logie	GERMAIN
Pneumo-phthisiologie	KALB
Pédiatrie	LARBRE
Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS
Médecine générale	VIALA
Bactériologie, parasitologie, virologie	VINCENT
Médecine légale	COLIN
Chimie biologique	BERTRAND

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS STAGIAIRES

Hématologie	MM. FAYRE-GILLY
Histologie et embryologie	GIROD
Chimie biologique	GRAS
Chimie analytique	MALLEIN

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Chirurgie générale	MM. MARION Pierre
Ophtalmologie	BONAMOUR
Chirurgie générale	De MOURGUES G.
Médecine générale	DEVIC
Obstétrique	DUMONT Martial
Urologie	DURAND
Chirurgie générale	FRANCILLON
—	SAUBIER
Neuro-psychiatrie	SCHOTT
Neuro-chirurgie	ALLEGRE
Electro-radiologie	CHASSARD
Orthopédie	FAYSSÉ

Hygiène	RIFFAT
Physiologie	FLANDROIS
Bactériologie	VIALIER-
—	RAYNARD
Pharmacie galénique	ROLLET
Stomatologie	MM. DUMAS
Oto-rhino-laryngologie	GAILLARD
Médecine générale	GARDE
Ophtalmologie	HUGONNIER
Chirurgie générale	MARET
Médecine générale	MORNEX
Chirurgie générale	MOUNIER-KUHN
Médecine générale	NORMAND
—	PERRIN André
Obstétrique	GARMIER
Médecine générale	NOEL
Orthopédie	SCHNEPP
Gynécologie obstétricale	NOTTER

EXAMINATEURS Président: Professeur P. MONNET

DE LA THÈSE : Assesseurs : Professeur J. THIVOLLET, Docteurs J. VIALIER-RAYNARD, J. FLEURETTE

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

Cette thèse est dédiée :

A MA FEMME

En gage de notre amour et notre vocation commune.

A NOTRE FILS, PIERRE-EMMANUEL

Dont le sourire est pour nous la plus belle des récompenses.

A MA MERE, A MON PERE

Ils ont été pour moi le plus bel exemple de l'union, du travail et de l'abnégation. Leur compréhension de tous les instants a su me montrer le droit chemin. Reconnaisant de tous leurs sacrifices, mon immense tendresse leur est acquise.

A MA GRAND-MERE

Elle consacra toute sa vie aux siens. Aucun mot ne saurait traduire la profondeur de mes sentiments.

A JEAN-FRANÇOIS, ANDRE, DANIEL et LAURENT

Avec toute l'affection de leur frère aîné.

A MES BEAUX-PARENTS

En témoignage de mon affection.

A MA MARRAINE ET A MON PARRAIN

Avec tous les sentiments affectueux que je leur porte.

A MES FILLEULS

A MES BEAUX-FRERES ET BELLES-SŒURS

A TOUTE MA FAMILLE

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. MONNET

Professeur de Bactériologie
à la Faculté de Médecine de Lyon
Médecin des Hôpitaux

Il nous a fait le grand honneur de nous ouvrir les portes de son Laboratoire et d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous avons bénéficié tout au long de notre troisième année de son enseignement magistral dont nous avons particulièrement apprécié la netteté et la logique.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. THIVOLET

Professeur à la Faculté de Médecine de Lyon

Médecin des Hôpitaux

Nous avons été sensible à la simplicité et à l'amabilité de son accueil.

Qu'il nous soit permis de lui exprimer toute notre gratitude pour l'intérêt qu'il a bien voulu nous porter.

MONSIEUR LE DOCTEUR J. VIALLIER-RAYNARD

Maître de Conférence Agrégé de Bactériologie

à la Faculté de Médecine de Lyon

Chef de Service à l'Institut Pasteur de Lyon

Il nous a fourni une partie de la matière de ce travail.

En espérant pouvoir en approfondir certains aspects à ses côtés, nous le prions d'accepter l'expression de nos remerciements et notre profond respect.

MONSIEUR LE DOCTEUR J. FLEURETTE

Maître de Conférence Agrégé de Bactériologie

à la Faculté de Médecine de Lyon

Il a bien voulu nous confier le sujet de cette thèse. Il nous a initié avec bienveillance et compétence aux techniques de la Bactériologie et de la Fluorescence, suivant pas à pas l'élaboration de ce travail.

Nous l'en remercions bien vivement et l'assurons de notre respectueux attachement.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-GÉNÉRAL INSPECTEUR BORON

Professeur Agrégé du Val-de-Grâce

*Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire
et de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes*

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COLONEL GROSSETETE

Bactériologiste des Hôpitaux des Armées

Médecin-Chef de l'Hôpital Militaire d'Instruction Desgenettes

Sous-Directeur de l'Ecole du Service de Santé Militaire

A NOS MAITRES DES HOPITAUX CIVILS ET MILITAIRES
ET DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON

MONSIEUR LE MÉDECIN-COLONEL P. MAITRE

Spécialiste des Hôpitaux des Armées

*Chef au Laboratoire de Bactériologie
et du Service des Contagieux de l'Hôpital Militaire
d'Instruction Desgenettes*

Nous lui devons notre goût pour la Microbiologie. Nous avons découvert en lui l'infatigable chercheur modeste et patient, ne ménageant pour nous ni son temps, ni sa peine. Il nous a souvent encouragé et fait profiter à maintes reprises de son esprit de clarté.

Qu'il en soit remercié et que cette thèse lui apporte un modeste témoignage de notre respectueuse admiration.

MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT D. BONNET

Spécialiste des Hôpitaux des Armées

*Adjoint au Chef du Laboratoire de Bactériologie
et du Service des Contagieux de l'Hôpital Militaire
d'Instruction Desgenettes*

Nous avons apprécié, au cours de notre stage dans le Service Contagieux, sa science clinique et sa grande bonté envers les malades.

Nous le prions d'accepter nos remerciements pour l'enseignement qu'il nous a prodigué.

MESSIEURS LES MÉDECINS-COMMANDANTS PAYEN ET FAVIER
Spécialiste des Hôpitaux des Armées

Nous les remercions de tous les conseils qu'ils nous ont donnés pendant notre séjour dans le Service des Contagieux.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-CAPITAINE J.-M. LABOUREL

Assistant des Hôpitaux des Armées

Il nous a fait l'honneur de son amitié ;
et pour sa coopération à la rédaction de
ce travail, nous le prions d'accepter nos
sincères remerciements.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-CAPITAINE PUSEL

Assistant des Hôpitaux des Armées

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. LACROIX

*Assistant au Laboratoire de Bactériologie
de la Faculté de Médecine de Lyon*

Assistant de Biologie des Hôpitaux

Nous ayant aidé dans l'élaboration de
ce travail, avec une bonne humeur et
une gentillesse constantes, qu'il nous
soit permis de lui témoigner notre pro-
fonde sympathie.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-LIEUTENANT

ET MADAME J., PERENNEC

En témoignage de notre solide amitié.

A TOUS MES AMIS

A MES CAMARADES DE L'ECOLE DU SERVICE

DE SANTÉ MILITAIRE

INTRODUCTION

Les antibiotiques et les sulfamides sont utilisés depuis longtemps en Clinique et l'étude de leur mode d'action a toujours intéressé les chercheurs.

Ce n'est que le développement des méthodes cytochimiques et de la microscopie électronique qui a permis de connaître, pour un certain nombre d'entre eux, les perturbations qu'ils entraînaient, soit sur la paroi bactérienne, soit sur les synthèses protéiques, en particulier celle des acides nucléiques.

Aussi, quand nous connaissons le rôle primordial joué par les acides désoxyribonucléique (D.N.A.) et ribonucléique (R.N.A.) dans la biologie cellulaire, il apparaît du plus haut intérêt de pratiquer une coloration différentielle spécifique de ces acides sur la même bactérie. C'est dans ce but que nous avons utilisé la microscopie en fluorescence et le fluorochrome Acridine Orange (A.O.).

En effet, dans des conditions techniques définies, le R.N.A. donne en combinaison avec l'A.O. une coloration rouge vif, le D.N.A. une coloration jaune vert. Cette coloration est remarquable par sa simplicité et sa grande sensibilité par rapport aux méthodes cytochimiques, difficiles et traumatisantes.

C'est une des rares colorations vitales qui permette de distinguer les deux acides nucléiques. Le seul inconvénient est d'ordre technique : c'est la nécessité d'être équipé pour la microscopie en ultra-violet.

L'emploi de l'A.O. en Histocytologie a déjà été fructueux. En Microbiologie, il a contribué au développement de nos connaissances sur le cycle de reproduction des virus et des bactériophages.

En Bactériologie, cette coloration est très peu utilisée, et nous avons voulu en reprendre l'emploi avec une double intention :

— Disposer d'une coloration différentielle facile à exécuter pour étudier la morphologie et le noyau des bactéries normales de différentes espèces.

— Cette technique étant au point, reprendre l'étude des altérations morphologiques des bactéries soumises à l'action de divers antibiotiques.

Nous tenterons ainsi de mettre en parallèle, d'une part les anomalies morphologiques et tinctoriales observées, et d'autre part les anomalies biochimiques, notamment celles portant sur les acides nucléiques, afin d'établir peut-être une liaison altérations biochimiques-altérations morphologiques.

PREMIERE PARTIE

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE PREMIER

LA COLORATION PAR L'ACRIDINE ORANGE

La fluorescence des micro-organismes peut être soit naturelle, soit induite. Des organismes qui n'ont pas une fluorescence intrinsèque suffisante peuvent être imprégnés avec des produits chimiques appelés fluorochromes ou fluors. Ces substances absorbent l'énergie rayonnante envoyée par la source de lumière et pendant le retour à l'état initial d'énergie se produit la fluorescence [40, 41, 150]. L'intensité présumée de cette fluorescence secondaire est le résultat de la fluorescence « primaire » qui subsiste après fluorochromisation et de la fluorescence ajoutée par les fluorochromes [115].

En appliquant ces phénomènes à des études microscopiques de produits biologiques, l'emploi de la lumière ultra-violette est généralement utilisé et les cellules brillent ainsi sur le fond noir.

L'acridine orange fut introduite en microscopie simultanément par trois auteurs, STRUGGER, BUKATSH et HAITINGER, en 1940, qui montrèrent ses possibilités comme coloration vitale des champignons, des levures, des cellules végétales et des spermatozoïdes des vertébrés [142, 31].

Ses effets multicolorés ont été remarqués depuis par de nombreux auteurs, surtout allemands, l'utilisant comme coloration vitale et diversement interprétés.

Mais en dépit des conditions expérimentales très différentes employées par les chercheurs, aussi bien dans

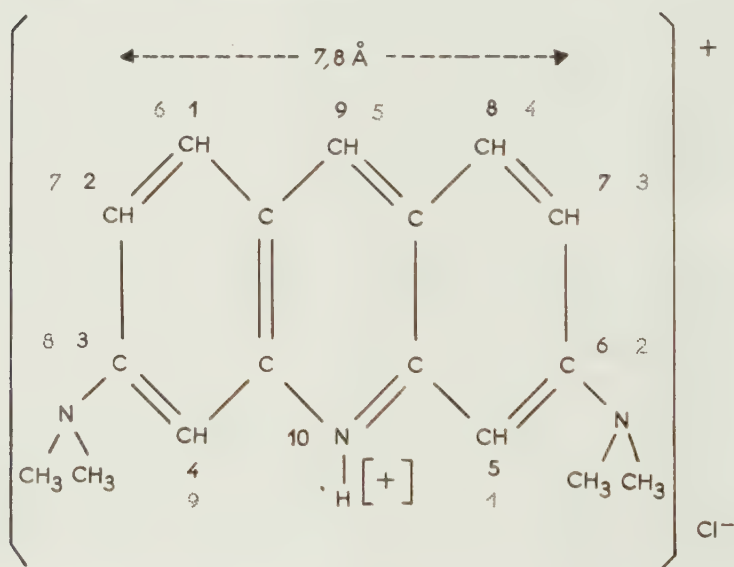
les domaines végétal, animal ou de la cytologie bactérienne, il apparaissait bientôt que l'acridine orange montrait la possibilité de mettre en évidence d'une façon élective les composants cellulaires contenant les acides nucléiques : les composants contenant du RNA se coloraient en rouge et ceux contenant du DNA en vert.

Ces travaux préliminaires ouvrirent la voie à l'utilisation de l'acridine orange dans les domaines les plus variés de la recherche et de l'utilisation pratique.

I. — Propriétés générales de l'acridine orange.

A. — PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'ACRIDINE ORANGE

a) FORMULE STÉRÉOCHIMIQUE.



L'acridine orange (3-6 bis-diméthyl-amino-acridine, pour le système allemand et 2-8 bis-diméthyl-amino-acridine pour le système anglais) est un des nombreux dérivés de l'acridine utilisée le plus souvent sous forme de chlorure. (Figure 1).

b) PROPRIÉTÉS SPECTROCHIMIQUES DE LA MOLÉCULE D'A.O.
EN FONCTION DU pH DE SON SOLVANT [164].

— Dans le domaine des pH alcalins la fluorescence se fait dans le « jaune ». Lorsqu'on approche du pH neutre, le cycle azoté de la molécule se charge et l'on aboutit à la formation d'un cation positif qui donne une fluorescence dans l' « orange ».

— La molécule d'A.O., placée dans un solvant à pH neutre, donne une fluorescence dans le « bleu-vert ».

— Dès que l'on passe dans le domaine des pH acides, seuls des cations positifs sont présents dans la solution et la fluorescence se fait dans le « rouge », ceci pour des taux de pH allant de 6 à 1,5.

— Lorsque l'on descend à des pH inférieurs à 1,5, des phénomènes de résonance ont lieu entre les cations positifs d'A.O. et la fluorescence se fait alors dans le « jaune ».

B. — SPECIFICITE DE L'AFFINITE TINCTORIALE
DES ACIDES NUCLEIQUES
POUR L'ACRIDINE ORANGE

Le mécanisme de la coloration différentielle des acides nucléiques n'est pas encore complètement élucidé et les phénomènes qui sont impliqués dans la coloration différentielle des acides nucléiques ont donné lieu à de nombreuses recherches.

Il convient de rappeler à ce sujet que certains travaux préliminaires avaient montré :

— tout d'abord l'affinité quasi élective de l'A.O. pour les acides nucléiques [59, 42, 43, 165, 132, 133, 81, 79, 80] ;

— ensuite la différence de coloration induite par l'A.O. selon qu'il s'agit de D.N.A. ou de R.N.A. [100, 5, 6, 12, 134, 44, 81].

a) MÉCANISME INTIME DE LA LIAISON ENTRE L'A.O. ET LES
ACIDES NUCLEIQUES.

1. *Etude de la liaison moléculaire A.O.-Acide nucléique.*

L'explication logique de l'affinité de l'A.O. pour les nucléoprotéines est qu'il existe un lien chimique entre la molécule de ce colorant basique et les composants acides des nucléoprotéines.

Les travaux actuels tendent à faire intervenir dans la fixation de l'A.O. sur les acides nucléiques deux ordres de liaisons :

— Les unes seraient représentées par la *fixation du colorant sur les groupements phosphates des acides nucléiques*.

— Les autres par des *liaisons de type Van Der Waals* sur toutes les parties découvertes de l'acide nucléique [97].

Des études plus précises en ce qui concerne le D.N.A. ont montré que le premier type de liaison se réaliserait par intercalage des molécules plates d'A.O. entre les paires de bases voisines de la double hélice de D.N.A. ; le deuxième type de liaison ne se fait qu'après saturation du premier [88, 89].

Certains auteurs ont même montré que l'interaction mutuelle des molécules d'A.O. liées à la surface du D.N.A. est plus faible que celle des molécules liées aux groupements phosphates [73].

2. Conséquences spectrophotométriques de cette liaison.

A l'heure actuelle, les faits biochimiques précédents ne sont pas encore satisfaisants pour expliquer à la fois les propriétés toxiques et mutagènes de l'A.O. et les réponses polychromatiques des deux types d'acides nucléiques [97].

En effet, quand un colorant fluorescent tel que l'A.O. se lie à un polynucléotide, deux types de complexes, avec des caractéristiques spectrales et fluorescentes différentes, peuvent se former *en fonction du rapport quantité de polymère/quantité de colorant* [141].

Un *complexe I* se réalise quand le rapport précédent est de 1/1 ; son spectre d'absorption se situe à 465 m μ . Il impliquerait la liaison des molécules de colorant avec

les groupements azotés 1 ou 10 des bases puriques et avec les phosphates diester du polynucléotide.

Le complexe II est produit quand la concentration du polymère est de 20 à 100 fois plus importante que celle du colorant ; son spectre d'adsorption se situe à 502 m μ , il impliquerait une liaison supplémentaire avec les phosphates terminaux du polynucléotide [140, 141].

Ces travaux effectués sur des polynucléotides synthétiques ont permis d'établir la liaison A.O.-acides nucléiques [3, 140, 7].

Le complexe I impliquant la liaison de la molécule d'A.O. à la fois avec les bases et les phosphates situés entre les nucléotides des polyribonucléotides.

Le complexe II formé par la liaison du colorant avec les phosphates terminaux à la fois des polyribonucléotides et du D.N.A.

La fluorescence verte du noyau coloré par l'A.O. serait le résultat de la formation du complexe II avec le D.N.A. La fluorescence rouge du cytoplasme refléterait la formation des complexes I et II avec le R.N.A.

Le complexe II spécifique du D.N.A. apparaîtrait de façon instantanée et se montrerait stable ; en revanche, le mélange des complexes I et II spécifique du R.N.A. se constituerait plus lentement et serait instable. D'ailleurs, récemment, cette liaison labile avec le R.N.A. a été confirmée [99].

Ses résultats sont à rapprocher du fait que la fluorescence verte ou rouge de l'A.O. est associée à un poids moléculaire haut ou bas des acides nucléiques [134, 100].

Actuellement on pense que le passage de la fluorescence « verte » à la fluorescence « rouge », avec comme stade intermédiaire le « jaune » et l' « orangé », est fonction du nombre de groupements phosphates saturés par l'A.O. Plus ces groupements sont nombreux, plus la coloration tend vers le « rouge ». Des expériences effectuées sur des

préparations purifiées d'acides nucléiques viraux ont permis d'établir que :

— le R.N.A. et une seule spire de D.N.A. avaient une configuration spatiale telle qu'elle favorisait le maximum de liaisons avec les molécules d'A.O., faisant apparaître ainsi une fluorescence « rouge » ;

— tandis que le D.N.A. habituel avec ses deux tours de spires, défavorable à la liaison, donnait une fluorescence « jaune-vert » [97]. D'ailleurs le D.N.A. à l'intérieur du noyau est caractérisé par un degré important de polymérisation et un haut niveau d'orientation, incluant à la fois ses formes en double spire et son organisation structurale à l'intérieur des chromosomes, expliquant ainsi sa fluorescence « verte » [84].

b) FACTEURS INFLUENÇANT LE MÉCANISME DE LA COLORATION PAR L'A.O.

1. Un des facteurs, le plus important, est le *pH*.

Nous avons vu précédemment les changements physico-chimiques de la molécule d'A.O. dans l'échelle des *pH*, l'acidité favorisant la formation des cations positifs de colorant et par là même la liaison A.O.-acides nucléiques [164]. Ainsi tous les chercheurs utilisant l'A.O. travaillèrent dans le domaine des *pH* acides aussi bien en histo-cytologie qu'en microbiologie.

2. La concentration du colorant dans la solution est à considérer dans le degré de liaison A.O.-nucléotides.

En effet, dans les solutions concentrées, la force de liaison des cations colorants entre eux est si forte qu'elle empêche ces derniers de se fixer sur les nucléotides et explique ainsi la fluorescence « rouge » des cellules traitées avec de telles solutions concentrées d'A.O. [66].

La liaison des cations entre eux, cette fluorescence « rouge » non spécifique, peut être déplacée par les « sels » (Cl_2Ca , Cl_2Mg , Cl Na , Cl K) et ainsi faire apparaître la coloration différentielle des acides nucléiques [12, 66]. A partir du moment où les sels sont utilisés

dans la différenciation, la concentration du colorant et le temps de coloration varient selon le matériel à étudier. Mais en fait ces deux facteurs n'ont pas une grande importance, une concentration faible nécessitant des temps plus longs de coloration qu'une forte concentration [5, 6, 12, 66].

3. Récemment certains auteurs ont montré *l'influence des ions métalliques* dans l'accouplement A.O.-R.N.A.

En effet, le complexe I serait modifié par les ions suivants : Cr, Cu, Ni, Co, Zn, Mg, Hg.

Le complexe II par : Cr, Cu, Ni, Co, Mg, Hg. Il se formerait ainsi un nouveau complexe (III) R.N.A.-A.O.-métal [126, 127].

4. *L'action de la lumière ultra-violette* est aussi importante.

En effet, pour les préparations fixées puis colorées, elle peut faire apparaître la différenciation tout comme le Cl_2Ca . Mais pour les préparations fraîches, la lumière ultra-violette provoque une perte de la fluorescence « rouge » du R.N.A. et l'on obtient ainsi des résultats identiques à ceux de la ribonucléase [12]. D'ailleurs cette altération de l'intensité de fluorescence de l'A.O. sous la lumière ultra-violette a été mesurée quantitativement [115].

Cet effet délétère de la lumière ultra-violette sur la liaison A.O.-R.N.A. est un des inconvénients majeurs de la coloration. Certains auteurs ont proposé un autre fluorochrome, la Coriphosphine « O », donnant une fluorescence différentielle des acides nucléiques, le D.N.A. dans le « vert », le R.N.A. dans les « rouge vif », ce dernier ne s'altérant pas sous les U.V. Mais cette technique de coloration est plus complexe et moins sensible que celle par l'A.O. [72].

5. En fait, on pense actuellement que les paramètres *pH*, *concentration de colorant*, *état métabolique de la cellule*, sont interdépendants mutuellement pour influencer le *temps de pénétration* du colorant dans la cellule [119].

c) CAUSES D'ERREURS.

Il convient de souligner que la notion de spécificité de l'acridine orange pour les acides nucléiques n'est pas absolue.

En effet, le colorant peut donner une *fluorescence rouge* avec les « MUCOPOLYSACCHARIDES » et cela, précisément dans des conditions identiques à celles auxquelles on est soumis lorsqu'on veut mettre en évidence les acides nucléiques [59, 12, 5, 62, 128, 121]. Néanmoins, pour d'autres auteurs, les solutions aqueuses de colorant sont incapables de mettre en évidence les « polysaccharides », et un traitement préalable des préparations par l'acide chlorosulfonique est nécessaire [49].

C'est pourquoi il convient de bien préciser que la fluorescence est le fait d'un acide nucléique, en mettant en œuvre, simultanément à la coloration par l'acridine orange, deux tests qui permettront une identification certaine :

a) *Le test à la Ribonucléase* élimine le R.N.A. et doit en conséquence entraîner l'extinction de la fluorescence rouge.

b) *De même le test à la désoxyribonucléase* qui détruit le D.N.A. supprimera la fluorescence verte [59, 12, 101, 128]. Certains biochimistes ont établi à ce propos que la molécule d'A.O., en plaçant ces groupes $N(CH_3)$ à proximité des groupes phosphates du D.N.A., inhiberait l'action de la désoxyribonucléase [87].

Ces causes d'erreurs peuvent être augmentées par l'influence toxique que possède l'A.O. vis-à-vis des cellules vivantes.

C. — TOXICITE CELLULAIRE DE L'ACRIDINE ORANGE

Il est à prévoir que l'accouplement du colorant avec les acides nucléiques, dont on connaît le rôle dans les différents métabolismes, pourrait entraîner des désordres importants dans la vitalité de l'élément cellulaire.

De fait, une action toxique et mutagène de l'acridine orange a été signalée depuis longtemps [86, 50, 1, 94, 158, 8], de même que son action « retardatrice » sur les mitoses cellulaires [124].

Quant au mécanisme intime de cette action, il est encore mal connu :

— pour certains il serait dû à la liaison même A.O.-Acide nucléique [109] ;

— pour d'autres, à des modifications de la structure hélicoïdale du D.N.A. sous l'influence de l'A.O. [88, 51] et à l'inhibition de la synthèse protéique [166], aboutissant à la multiplication d'un D.N.A. modifié [89] ;

— mais le fait certain est le rôle joué par la *photosensibilisation de ce colorant à la lumière du jour* [63, 64, 65, 52, 60, 48, 47], la présence d'oxygène ou d'oxyde nitrique étant indispensable pour causer des altérations chromosomiques importantes [139].

Cette action toxique et mutagène de l'A.O. a été le point de départ de certains travaux de Cancérologie expérimentale montrant que l'A.O., à des doses très faibles, pouvait avoir une action anti-tumorale [76].

D. — PROPRIETES PHARMACODYNAMIQUES

En dehors de son action sur la « génétique cellulaire », signalons deux autres propriétés intéressantes de l'A.O. :

— D'une part elle augmente le potentiel de la membrane de la fibre nerveuse myélinisée, et diminue son excitabilité par action sur les ions Cl — [74].

— D'autre part, certaines expériences ont établi que l'A.O. avait une action sensibilisatrice vis-à-vis de l'action des moutardes à l'azote [117, 146].

II. — Applications de la coloration par l'acridine orange en biologie.

A. — EN HISTOCYTOLOGIE

1. EN HISTOLOGIE GÉNÉRALE, des essais ont été réalisés dans le but d'étudier la cytologie des tissus animaux *in vivo* et *in vitro* [5, 6, 12, 43, 13, 163, 84].

Récemment, les « lysosomes », en particulier des cellules hépatiques, ont été colorés en « rouge flamme » après injection I.V. d'A.O. chez le rat [75].

Mais c'est surtout dans le domaine des organes génitaux masculins et féminins que l'Histologiste a trouvé dans l'A.O. un outil intéressant pour étudier la morphologie cellulaire normale et anormale :

— En particulier certains auteurs ont étudié les spermatozoïdes des mammifères donnant une fluorescence soit « verte », soit « rouge », selon qu'ils étaient vivants ou morts [16]. Aucun ne faisait mention d'une coloration différentielle à l'intérieur même des cellules ; cette dernière fut cependant obtenue avec certaines conditions, quelques années plus tard, le noyau se colorant en « vert », l'acrosome en « rouge » chez les spermatozoïdes vivants, les morts donnant une fluorescence « jaune-vert » [17].

— Dans un autre domaine, de nombreux chercheurs ont essayé de définir la morphologie normale des cellules du tractus génital féminin, et en particulier dans des frottis vaginaux. Les cellules montraient, à la phase folliculaire, un noyau vert pâle et un cytoplasme vert foncé parsemé de granulations rouges, la fluorescence des bacilles de Doderlein apparaissant dans les rouges [46, 161].

— Actuellement des dispositifs endoscopiques spéciaux permettent l'observation directe, *in situ*, de différents organes après coloration vitale par l'Acridine orange [135].

2. EN HÉMATOLOGIE, l'étude de la cytologie sanguine humaine ou animale a suscité de nombreux travaux : soit sur les centres hématopoiétiques [61, 131, 28], soit

sur le sang circulant [77, 83]. Certains chercheurs ont comparé, après fluorochromisation par l'A.O., les spectres d'absorption du sérum de sujets sains et ceux de malades atteints de néoplasmes pulmonaires [69].

3. EN CANCÉROLOGIE, les connaissances actuelles montrant qu'une haute teneur en R.N.A. dans le cytoplasme est caractéristique de toute cellule en état de synthèse protéique rapide [18], ont conduit de nombreux auteurs à l'identification par l'A.O. des cellules néoplasiques [11, 156], bien entendu après avoir défini la morphologie des cellules dites « bénignes » [68].

Cette identification des cellules néoplasiques par l'A.O., basée sur l'importance de la fluorescence rouge du R.N.A., s'est étendue à différentes disciplines :

- de l'oto-rhino-laryngologie [162],
- de la pneumologie [10, 120],
- de la gastro-entérologie [154, 112, 107],
- et surtout de la gynécologie [14, 71, 53, 118, 4, 160, 95, 159].

Il faut bien reconnaître que ces tentatives d'applications pratiques n'ont pas encore donné lieu à des méthodes diagnostiques répandues du fait des nombreuses critiques auxquelles elles ont donné lieu : si ces méthodes sont vis-à-vis des méthodes classiques plus simples et plus rapides, elles sont pour certains auteurs, du fait des causes d'erreurs et des propriétés toxiques de l'A.O., ni sûres, ni rationnelles, ni économiques [95, 108, 159, 160].

Sur le plan biophysique, des études récentes par les rayons X de la liaison A.O.-R.N.A. ont permis d'établir que le R.N.A. des cellules malignes avait une structure et une destinée différentes du R.N.A. des cellules normales [136].

4. La coloration par l'A.O. a aussi trouvé un champ d'application en HISTOPHYSIOLOGIE MUSCULAIRE.

En effet, la fluorescence primaire des fibres musculaires fraîches est « bleu pâle », tandis qu'aucune fluorescence

n'apparaît avec les fibres glycérinées ; après coloration par l'acridine orange, les fibres fraîches donnent une fluorescence « jaune ou vert-bleu », les glycérinées « rouge » ; après contraction, les dernières apparaissent « jaunes » comme les fibres fraîches [147].

Ces résultats sont à rapprocher des données biochimiques selon lesquelles l'A.O. inhibe la contraction musculaire en entrant en compétition avec l'A.T.P., les molécules d'A.O. et d'A.T.P. ayant les mêmes « sites » de liaison [70].

B. — EN MICROBIOLOGIE

1. EN PARASITOLOGIE.

a) La mise en évidence de parasites divers serait facilitée par l'utilisation de la coloration par l'A.O., visualisant à la fois la morphologie du noyau et du cytoplasme.

C'est ce qui ressort de certains travaux concernant le diagnostic des *levures et des champignons* dans des prélèvements pathologiques [39, 32, 52, 33, 110, 15, 34, 125], ou encore des *Trichomonas* [152, 7, 137, 13].

b) Dans le domaine de l'*Helminthologie*, l'A.O. a été utilisée pour différencier les Nématodes pathogènes et non pathogènes, la cuticule des larves pathogènes se colorant en « rouge cuivre » [9]. D'ailleurs cette méthode a été appliquée dans le domaine de la pathologie végétale pour tester la viabilité des constituants kystiques de vers de la racine de pomme de terre [85].

Certains auteurs ont même étudié l'embryogénèse des Nématodes, obtenant ainsi une coloration différentielle des acides nucléiques dans l'Oogonie, l'oocyte et l'embryon [138].

c) L'A.O. s'est aussi montrée un colorant intéressant des *parasites sanguicoles* [37] tels que les Hématozoaires du paludisme, où l'on a pu montrer qu'elle était capable

de mettre en évidence les Plasmodes « rouge mat » dans les hématies « vert vif » [122].

Mais cette méthode diagnostique, valable sur des étalements minces, ne l'est plus sur des frottis épais du fait des nombreux artéfacts et par là même cette technique n'apporte aucun avantage par rapport aux techniques habituelles [56].

La coloration des trypanosomes s'est aussi avérée possible [144, 122], de même que celle des leptospires et des microfilaires [122, 138]. Les premiers auteurs utilisant l'A.O. comme colorant vital des trypanosomes dans le sang décrivirent leur fluorescence verte, mais ne faisaient pas mention d'une coloration différentielle des acides nucléiques [143], qui pourtant fut obtenue quelques années plus tard [122].

Des auteurs lyonnais ont montré récemment que la coloration de fluorescence à l'A.O. rattachée à la surcharge de D.N.A. et R.N.A. de la cellule sarcomateuse disparaissait sous l'influence d'extrait de *Trypanosoma Cruzi* [36].

d) *Des protozoaires*, du genre *Anaplasma*, parasites des Bovidés, ont montré une fluorescence « orange brillant » après coloration par l'A.O. [57].

2. EN VIROLOGIE.

a) *La coloration par l'A.O.* est extrêmement répandue :

— Elle permet en effet d'apprécier les modifications dans le comportement du R.N.A. et du D.N.A. de cellules soumises à une action virale [6, 3, 38, 54, 98, 111, 103].

— Elle permet en outre de mettre en évidence l'acide nucléique viral à l'intérieur des cellules infectées [3, 106, 104, 6, 55, 67, 129, 35, 102, 151, 96] et son étude dans des préparations purifiées de virus [98].

b) *L'interprétation* des phénomènes observés dans de telles conditions demeure néanmoins délicate : nous avons déjà signalé la possibilité de fluorescence non spécifique.

Il découle de ces études virologiques que des témoins très nombreux sont obligatoires, faisant appel soit aux tests enzymatiques (ribonucléase, déoxyribonucléase), soit encore à des colorations électives telles que la réaction de Feulgen, soit enfin et surtout à la technique des anticorps fluorescents [98, 3, 30]. Les difficultés dans l'interprétation des interréactions virus-cellule hôte sont encore augmentées par le pouvoir mutagène [105, 26] et de photo-inactivation de l'A.O. sur les virus [97, 98, 92].

c) Dans les applications de l'A.O. en Virologie, il convient de citer les travaux relatifs aux *rapports phage-bactérie* qui ont permis d'apprécier les modifications des acides nucléiques bactériens entraînés par les phages [23, 25].

3. EN BACTÉRIOLOGIE.

L'étude proprement dite des acides nucléiques par la technique de l'A.O. de bactéries est encore peu répandue. Nous distinguerons cependant, dans le champ d'application de l'A.O. en Bactériologie, deux domaines :

— Celui de la recherche pure où le plus souvent le chercheur s'adresse aux propriétés toxiques ou mutagènes de l'A.O.

— Celui des applications pratiques où ses propriétés colorantes sont au premier plan.

a) *Dans le domaine de la recherche.*

En dehors des travaux relatifs aux acides nucléiques des bactéries parasitées par les phages [3, 2] et de ceux concernant les modifications des acides nucléiques entraînées chez le Staphylocoque pathogène par l'A.O. [116], nous devons signaler deux ordres de travaux récents :

— Les uns, utilisant l'A.O. comme moyen d'élimination de facteurs de résistance à différents antibiotiques chez de multiples souches de Shigella et d'Escherichia [157].

— Les autres, inspirés de résultats obtenus en Histocytologie [155, 153, 65], se servant de matériel bactériologique, en l'occurrence *Micrococcus lysodeikticus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*, pour étudier les isothermes d'adsorption du colorant [8].

Il faut noter que la majorité de ces recherches font état de la coloration ou tout au moins de l'affinité différentielle de l'A.O. vis-à-vis des deux types d'acides nucléiques, ce qui contraste paradoxalement avec la plupart des travaux relatifs aux applications pratiques de la coloration.

b) *Dans le domaine pratique.*

En dehors des tentatives qui ont été faites pour mettre en évidence les germes et les cellules dans divers produits pathologiques tels que le liquide céphalo-rachidien [82], les sécrétions génitales [152, 3, 14] ou la recherche du B.K. dans les crachats [123], jusqu'ici cette méthode n'a été appliquée que pour identifier les bactéries mortes ou vivantes au sein d'une préparation [130, 142, 58, 91, 148, 90, 20].

C'est le point le plus controversé de la littérature :

— Pour certains, les bactéries vivantes sont « vertes », les tuées sont uniformément « rouges » [142, 143, 145].

— Pour d'autres, au contraire, elles sont soit « rouges », soit « vertes » [29].

On peut se demander si ces discordances ne sont pas dues aux différences de techniques employées [79, 80, 81] :

— pH de la solution colorante [130] ;

— Comportement vis-à-vis du Gram des bactéries [58] ;

— Etat métabolique des bactéries [91, 148].

Ce que l'on appelle « effet Strugger », fluorescence différentielle des composants vivants (verts) ou morts (rouges), a été le sujet de nombreuses théories souvent discordantes [145, 66, 19, 12, 23, 130].

Cependant la perte de la viabilité, associée à la fluorescence « rouge », a été confirmée [78]. Des travaux plus

récents ont montré que la fluorescence « verte » des cellules vivantes est associée aux constituants riches en acides nucléiques [5]. Certaines observations [7, 24, 113, 22] ont établi que le D.N.A. peut former deux complexes que nous appellerons pour notre part A et B. L'un, le A, se forme quand la concentration relative d'Acridine orange par rapport à celle du D.N.A. est minime, faisant apparaître ainsi la fluorescence « verte ». L'autre, le B, se formerait quand le rapport A.O./D.N.A. s'élèverait, donnant une fluorescence dans le jaune-orange-rouge. Le changement de fluorescence du vert au jaune est le « point critique » de cette transition avec passage du complexe A au complexe B, tandis que le changement ultérieur du jaune au rouge n'est pas instantané, apparaissant comme un témoin de la seule augmentation de concentration de l'A.O., sans formation de nouveau complexe. *L'effet Strugger peut être expliqué au terme de ces observations comme un « dommage des structures riches en D.N.A. dans les cellules altérées ou mortes ».*

Certains auteurs ont tenté d'étudier le « point critique » de passage du vert au jaune en traumatisant à l'aide d'ultra-sons une souche d'*Escherichia coli* [114].

Malgré ces quelques appuis biochimiques, *le diagnostic de viabilité cellulaire par la coloration à l'A.O. a un champ d'application limité [3] et serait même sans valeur pour certains bactériologistes [93].*

Néanmoins, cette coloration permettrait de mettre en évidence deux sortes de luminescences chez les spores de *Bacillus brevis* en rapport avec le nombre de spores quiescentes [45].

Récemment certains auteurs ont utilisé la coloration par l'A.O. pour étudier, du seul point de vue morphologique, le matériel nucléaire d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis*. Comparée à d'autres techniques de coloration nucléaire, *l'A.O. s'est révélée, avec le Giemsa après hydrolyse acide, un des meilleurs moyens de dénombrement nucléaire [27].*

Cette affinité pour le matériel nucléaire et les acides nucléiques en général a-t-elle présidé à l'introduction de l'A.O. en Bactériologie spatiale ?

C'est ce qui semble ressortir de certains travaux sur la détection de la vie extra-terrestre où l'A.O. se montre comme un moyen quantitatif rapide et très sensible de mise en évidence de l'acide nucléique de bactérie viable ou non. En effet, la réaction est sensible à 8×10^{-14} g d'acide nucléique [21].

Nous voyons donc qu'en fait la littérature se montre pauvre en ce qui concerne les applications de la coloration différentielle des acides nucléiques dans le domaine de la Bactériologie pure.

C'est pourquoi il nous a semblé utile d'essayer de déterminer si la mise en œuvre de la coloration par l'acridine-orange sur les bactéries au contact avec divers antibiotiques était susceptible d'ajouter, ou tout au moins de se rapprocher des renseignements recueillis par l'observation au microscope optique et électronique d'une part, et aux investigations biochimiques d'autre part.

CHAPITRE II

ALTERATIONS DE LA MORPHOLOGIE BACTERIENNE PRODUITES PAR LES ANTIBIOTIQUES

Les très nombreux travaux étudiant l'action des antibiotiques sur les bactéries ont permis de relever des anomalies de la taille, de la morphologie générale, de l'affinité tinctoriale, et mis en évidence par ailleurs certaines modifications des structures internes et des altérations de la division cellulaire.

I. — Variation de la taille.

Ces variations peuvent se traduire soit par une augmentation, soit par une diminution.

L'AUGMENTATION a été observée par de nombreux auteurs sur les bactéries soumises à l'action de la *pénicilline* ; ce phénomène s'observe aussi bien chez les *bacilles qui s'allongent* [30, 44, 28, 86, 87, 39, 40, 70, 26, 22] que chez les *cocci s'hypertrophiant* [30]. Ces augmentations de taille sont contemporaines, aussi bien pour les bacilles que pour les cocci, d'une tendance à la disposition en longues chaînes [85].

On a pu remarquer que ces modifications étaient en rapport avec la concentration en antibiotique. Pour certains, l'allongement est d'autant plus grand que les doses d'antibiotique sont faibles [30] ; pour d'autres, au con-

traire, il se montre d'autant plus important que les concentrations sont fortes [44].

Ce qui est valable dans le cas de la pénicilline est retrouvé de façon inconstante lorsqu'on utilise d'autres antibiotiques.

Avec le *Chloramphénicol* et les *tétracyclines*, un discret allongement a été noté chez les bactéries Gram négatif [86. 4], de même avec les bactéries soumises à l'action de l'*érythromycine* [76].

Dans le cas de la *streptomycine*, l'opinion des auteurs varie.

Pour certains, l'action de cet antibiotique serait comparable à celle de la pénicilline. Le phénomène serait toutefois moins prononcé [69]. Cette modification n'interviendrait qu'après la cinquième heure de contact avec l'antibiotique [98]. Pour d'autres auteurs, en revanche, la streptomycine ne provoque aucune modification de la taille, même à doses importantes [48]. En ce qui concerne les Mycobactéries, une étude a pu montrer que certains agents de cette famille accusaient une augmentation de la taille lorsqu'ils étaient cultivés en présence de streptomycine [52].

L'étude de conduite avec des antibiotiques du groupe *Polymyxine-Colimycine* a montré que la *polymyxine B* et la *polymyxine E* provoquaient l'apparition de « formes géantes » dans les cultures de bactéries Gram négatif [71]. Pour la *colimycine*, en revanche, il ne semble pas que ce phénomène ait pu être retrouvé.

Ces constatations sont à rapprocher de celles qui avaient été faites par les auteurs utilisant les *sulfamides* mis en présence soit de cocci Gram positif [73, 90], soit de bacilles Gram négatif [71]. On doit souligner que dans ces expérimentations, l'augmentation de la taille apparaissait également après un délai variant de 5 à 8 heures [62].

Quant à la *Novobiocine*, elle provoquerait une « filamentisation » des seuls bacilles Gram négatif [7].

L'examen de la littérature fait apparaître que c'est l'augmentation de la taille des bactéries qui est observée le plus fréquemment lorsque celles-ci sont mises en contact avec des antibiotiques divers, et singulièrement la pénicilline.

Quant à la RÉDUCTION DE LA TAILLE, elle n'a été notée que par un petit nombre d'auteurs [90, 81, 98].

II. — Variation de la morphologie.

A. — Outre les variations de taille que montrent les bactéries cultivant au contact d'antibiotiques, d'importantes modifications de la morphologie générale peuvent se manifester. Pour celles-ci, la transformation en SPHÉROPLASTES paraît être la plus caractéristique. Mais elle n'est observée qu'avec la seule *pénicilline*. Certains auteurs toutefois ont mentionné des formes analogues avec le *sulfathiazol* [12].

On sait les discussions auxquelles ont donné lieu ces formes particulières qui ont été baptisées tour à tour « formes hypertrophiques », « formes géantes » ou « large bodies » [85], « protoplastes » [72].

En fait, il a été montré que l'on devait distinguer deux phénomènes :

1° La production de « *protoplastes* » telle que l'on peut l'obtenir par le lysosyme sur les bactéries en milieu hypertonique. De semblables formes ne conservent plus la moindre trace de paroi bactérienne [104].

2° La production de « *sphéroplast*es » obtenue avec la pénicilline et qui se caractérise par le fait que subsistent après traitement des fragments de paroi bactérienne [5, 44, 47].

La transformation en sphéroplaste a pu être observée par de très nombreux auteurs, utilisant les bactéries les plus diverses, pathogènes ou saprophytes :

— que celles-ci soient asporulées comme *Escherichia coli* [66, 67, 68, 33, 41, 44, 46, 42], *Proteus* [28, 44, 72, 70,

63, 87, 95], *Salmonella* [66, 67, 68, 70, 33, 102], *Brucella* [38], *Staphylococcus* [80, 14], *Streptobacillus moniliformis* [87];

— ou encore sporulées, aérobie comme *Bacillus anthracis* [44] et anaérobie tels *Clostridium tetani* et *Clostridium Butyricum* [56, 55].

Des sphéropastes ont aussi été obtenus avec des germes moins classiques comme les *Aerobacter* [31, 32, 43, 44], *Xanthomonas phaséoli* [82] et *Alcaligenes faecalis* [64, 65].

Plus récemment on a signalé la formation des sphéropastes à l'aide de pénicilline de synthèse telle que l'*ampicilline* [92].

De même la « *cephalotine* », apparentée chimiquement avec l'acide 6-amino-pénicillanique, induirait la formation de sphéropastes chez *Vibrio comma* [15].

Ces sphéropastes exigent pour apparaître dans les cultures des conditions qui sont maintenant bien précisées : il faut tout d'abord que la *concentration* en antibiotique soit à un taux légèrement inférieur au taux inhibiteur ; ceci entraîne comme conséquence que les concentrations de pénicilline à utiliser se montrent variables selon les germes envisagés.

La *température* paraît être également un facteur à prendre en considération ; ici encore ce facteur doit être adapté à la bactérie étudiée [45]. L'*hypertoncité du milieu* favorise en outre l'action de la pénicilline [41].

La survie des sphéropastes exige elle aussi des facteurs bien déterminés de tonicité et de pH [72, 46, 92] et la destinée de ces formations est variable [63, 68, 100].

B. — Les formes L ou formes voisines peuvent être obtenues avec des antibiotiques divers. C'est ainsi que le *chloramphénicol* peut donner naissance à des « pseudo-formes L » incapables de cultiver [23].

La *novobiocine* transforme certaines bactéries Gram négatif en formes L [60], mais c'est la pénicilline qui permet d'obtenir avec la plus grande fréquence ces

formes L [105]. En effet, les antibiotiques, dont le site d'action primaire est la paroi bactérienne, n'inhibent pas la pousse des formes L [53].

III. — Variation de l'affinité tinctoriale.

En dehors de certains travaux avec la coloration argentine [70], l'altération de l'affinité tinctoriale a surtout été étudiée avec la COLORATION DE GRAM. Elle affecte essentiellement les bactéries Gram positif. La perte de la faculté de conserver le Gram a été signalée avec le *staphylocoque* soumis à l'action de la *pénicilline* [59].

Cette propriété s'accompagne, en outre, de modifications de la taille affectant tous les types qui ont été rappelés plus haut, en particulier l'apparition de « formes en bâtonnets » [59, 6]. Elle est également contemporaine de changements dans les propriétés biochimiques de la bactérie [19]. Pour certains auteurs, cet état serait réversible. Les formes en bâtonnets repiquées dans un milieu exempt d'antibiotique retrouveraient l'aspect en cocci Gram positif [6]. Mais il faut bien dire que ces propriétés sont très discutées et le plus souvent niées [37, 83].

Récemment certains auteurs ont décrit des propriétés quelque peu analogues avec les *streptocoques* du groupe A soumis à des concentrations sub-inhibitrices de pénicilline [79].

Par ailleurs, on a pu établir que les colibacilles « filamentisés » par l'action de la *Novobiocine* avaient perdu la propriété de se colorer par le *bleu de méthylène* [11].

IV. — Variation de la structure interne.

Les modifications des structures internes ont pu être appréciées grâce à la mise en œuvre des techniques d'investigations destinées à mettre en évidence le noyau bactérien d'une part, et les altérations des processus biochimiques intracellulaires d'autre part.

A. — LES TECHNIQUES MICROSCOPIQUES.

L'élimination de l'acide ribonucléique à l'aide de la ribonucléase suivie des colorations classiques de l'acide déoxyribonucléique du noyau a montré que celui-ci présentait une morphologie normale, mais que les formes longues induites par la *pénicilline* étaient en fait multi-nucléées [99].

Ces notions, exactes au microscope optique, ont été remises en cause par la microscopie électronique. En effet, certains auteurs ont montré des altérations des « corps chromatinien » chez une souche d'*Escherichia coli* qui, après une incubation de 2 heures à 37° C dans du bouillon ordinaire, était repiquée dans le même milieu contenant de 10 à 100 unités de pénicilline/me [20].

Avec le *Chloramphénicol*, le noyau présente, au contraire, après coloration et examen au microscope à contraste de phase, des déformations s'accompagnant éventuellement d'une augmentation de sa densité, tantôt c'est une simple augmentation de taille qui est observée avec retour au volume normal si la bactérie est repiquée sur un milieu sans antibiotiques [103, 94, 21, 34], tantôt il s'agit d'une fragmentation avec dispersion des masses nucléaires parmi la cellule hypertrophiée [4]. Ces résultats furent d'ailleurs confirmés au microscope électronique [58].

Des phénomènes identiques ont pu être observés notamment avec les antibiotiques du groupe des *tétracyclines* [21, 94] et de la *streptomycine* [96]. Les *sulfamides* ne semblent pas entraîner de modifications majeures du noyau en dehors de l'hypertrophie avec conservation du rapport nucléo-plasmatique [75].

Dans le cas de la *colimycine*, les constatations varient selon les germes. Des études effectuées au microscope électronique ont montré que les bactéries Gram négatif présentent des pertes de substance nucléaire, tandis que les bactéries Gram positif apparaissent intactes. Mais pour l'une et l'autre catégories de bactéries, la membrane cellulaire semble recouverte d'un matériel nouveau, sans

pour autant présenter de modifications de sa structure. Parallèlement les granulations cytoplasmiques apparaissent diminuées en nombre [16, 17].

Des travaux plus récents, toujours à l'aide du microscope électronique, ont montré trois stades dans l'action de la *colimycine* sur *Escherichia coli*.

— Un premier stade, avec orientation axiale du matériel nucléaire et invasion de celui-ci par du matériel cytoplasmique.

— Un deuxième stade, montrant une perte de substance nucléaire avec aspect granulaire du cytoplasme.

— Enfin un troisième stade, caractérisé par la disparition des granulations cytoplasmiques, le mésosome et la membrane de la paroi cytoplasmique étant conservés [57].

B. — LES TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.

Elles ont permis de déterminer avec précision les perturbations métaboliques entraînées par l'action des antibiotiques.

On sait maintenant que la *pénicilline* se combine de façon irréversible avec certains constituants de la *paroi bactérienne*. L'antibiotique inhibe en outre de façon spécifique la synthèse du matériel de la paroi et interfère avec la formation de muco-complexes ou de mucopeptides pariétaux en empêchant l'incorporation des acides aminés dans les peptides des mucopeptides de la paroi cellulaire [24]. La pénicilline ne modifierait pas le taux relatif des différents constituants de la paroi cellulaire ; leur proportion par rapport aux mucopeptides serait diminuée [88]. Cependant la question reste encore posée de savoir si l'action antibiotique est vraiment une action directe sur la synthèse de la paroi, ou si elle est la conséquence d'un autre effet, en rapport par exemple avec la formation des nucléotides précurseurs [13].

C'est par leur action sur la *membrane cytoplasmique* qu'agissent les polymyxines et la *colimycine*. Le produit

agit sur la membrane cytoplasmique et détruit sa fonction normale de barrière perméable sélective [84, 107]. On a pu montrer, tout au moins en ce qui concerne la polymyxine, qu'un complexe Polymyxine-membrane, de nature phospholipidique, se formait [13].

C'est par un mécanisme analogue qu'agirait la *novobiocine* [8, 29], l'échelle des pH de 5 à 8 favorisant cette action [3], provoquant ainsi une croissance de la perméabilité, avec fuite de R.N.A., des protéines [8] et des ions Mg^{++} [11]. L'inhibition de la synthèse protéique des acides nucléiques ne serait d'un effet secondaire [106]. Néanmoins l'action de la novobiocine aurait comme effet primaire, d'ailleurs discuté, une inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (Cell Wall) et comme effet secondaire, une inhibition de la synthèse protéique et des acides nucléiques [106].

Quant aux *tétracyclines* et au *chloramphénicol*, ils agissent directement sur le *métabolisme protéique* en interférant avec certaines réactions de phosphorylation ou en bloquant tout processus de synthèse protéique [10, 29, 3, 36, 107]. Ces deux antibiotiques interfèrent de façon légèrement différente sur la liaison du R.N.A. avec certains constituants des ribosomes [61].

Néanmoins les biochimistes ont établi que le *chloramphénicol* stimulait la synthèse du R.N.A. Cette stimulation aboutissait à la formation d'un R.N.A. nouveau, de nature hétérogène et instable, d'un poids moléculaire plus petit que le normal [3].

L'érythromycine, bien que chimiquement différente, aurait un mode d'action sur les bactéries sensibles, identique à celui du chloramphénicol, mais un effet inhibiteur plus faible sur les acides nucléiques et plus important sur les protéines [9].

Actuellement on pense que les *sulfamides*, antagonistes de l'acide para-aminobenzoïque bactérien, inhibent principalement la synthèse des protéines [27, 3, 107].

Le processus d'action de la *streptomycine* n'est pas encore complètement élucidé [97]. Il est bien connu qu'elle

agit surtout en inhibant les synthèses protéiques [51]. Mais on a pu établir qu'elle modifiait aussi d'une part l'intégrité de la membrane cellulaire [2, 50], d'autre part la synthèse des acides nucléiques [18, 93, 89].

Certains auteurs ont tenté d'établir la séquence de ces effets à l'aide des isotopes radioactifs, streptomycine marquée en C^{14} , ions cellulaires en K^{48} [25, 35, 49].

a) L'effet primaire serait une modification de la perméabilité de la membrane cellulaire par absorption de l'antibiotique sur la surface de la bactérie. On noterait à ce moment-là une excrétion d'ions K^+ , une stimulation transitoire de la synthèse du R.N.A. et enfin une inhibition de la synthèse des protéines concordant avec la perte de la viabilité cellulaire.

b)) Les effets secondaires, plus tardifs, seraient en relation avec une pénétration profonde de la streptomycine dans les espaces intra-cellulaires. On noterait alors une diminution de la respiration et enfin une inhibition de la synthèse des acides nucléiques, avec excrétion de nucléotides, précipitation du D.N.A. [89, 18] et inhibition totale de la synthèse du R.N.A. Ces effets secondaires n'auraient aucune relation avec l'effet léthal proprement dit de la streptomycine [101].

Quant à la *furadoïne*, n'étant ni un antibiotique, ni un sulfamide, elle est actuellement classée dans les anti-septiques. Son mode d'action est pratiquement inconnu. Certains travaux font cependant état de modification de la synthèse des acides nucléiques phagiques, en particulier du D.N.A. [78]. En fait, il est probable qu'elle agit surtout en inhibant certaines réactions enzymatiques de la bactérie [107].

V. — Action sur la reproduction bactérienne.

D'après les données précédentes, il apparaît que les phénomènes de reproduction bactérienne vont être gravement perturbés, à des doses inférieures aux doses bactériostatiques.

L'action élective de la *pénicilline* sur la paroi bactérienne explique que la division nucléaire puisse s'opérer de façon normale, sans être suivie d'une division de la bactérie et donner naissance à des formes longues multinucléées avec conservation de la morphologie normale des noyaux.

Au contraire, il a été rapporté plus haut que le *chloramphénicol* entraînerait des modifications de la morphologie du noyau. Des études plus précises ont montré que celles-ci s'accompagnaient d'altérations du processus de division nucléaire portant essentiellement sur des anomalies des chromosomes observées lors de la métaphase, mais n'empêchaient pas la division cellulaire de se produire [1]. L'hypertrophie nucléaire et la fragmentation du noyau qui ont été signalées s'expliquent en fait par la fusion de plusieurs noyaux qui donnent naissance à des masses nucléaires plus ou moins volumineuses à l'intérieur d'une bactérie globalement augmentée de volume [91].

*
* *

Il nous est apparu intéressant de rechercher si la technique de mise en évidence des acides nucléiques par l'*acridine orange* pouvait offrir un champ d'investigation plus étendu que celui des colorations classiques utilisées par les auteurs.

La littérature en effet ne mentionne pas d'études conduites avec cette méthode.

DEUXIEME PARTIE

TRAVAIL PERSONNEL

Notre travail a comporté deux étapes :

1) Mise au point d'une technique de coloration des bactéries par l'Acridine orange.

2) Application de cette technique à l'étude des modifications entraînées par l'action des antibiotiques sur les bactéries.

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUE DE LA COLORATION PAR L'ACRIDINE ORANGE

I. — Préparation du matériel de coloration et de microphotographie.

A. — LES PRODUITS CHIMIQUES utilisés furent :

a) *L'acridine orange* standard « FLUKA » en solution aqueuse à 0,1 %, renouvelée toutes les semaines et conservée à l'abri de la lumière.

b) *Le tampon phosphate à pH 6 :*

— Au préalable, nous avons préparé les deux solutions aqueuses suivantes :

I) $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K.M}/15$, soit 9,078 g./litre.

II) $\text{PO}_4\text{H Na}_2\text{.M}/15$, 12 H_2O , soit 23,878 g./litre.

— Pour obtenir ensuite le tampon pH 6, nous réalisons le mélange suivant :

4 volumes de I) pour 1 volume de II).

c) La solution aqueuse de *chlorure de Calcium* à 0,1 M, soit 14,7 g/l.

d) *Le mélange Alcool éthylique absolu-Ether éthylique* dans le rapport 1/1.

B. — LE DISPOSITIF PHOTO-MICROSCOPIQUE se composait :

- a) d'un microscope B.B.T. ;
- b) d'une lampe d'excitation à ultra-violet : OSRAM HBO.200 ;
- c) d'un filtre d'excitation : ZEISS BG 12 ;
- d) d'un filtre d'arrêt : ZEISS KG 1 ;
- e) des objectifs simple et à immersion (PLAN 100/1,25) ;
- f) d'un appareil photographique « FOCA », chargé d'un film « KODAK » HIGH SPEED « EKTACHROME B » - 125 ASA.

II. — Méthodes expérimentales.

A. — TECHNIQUES DE COLORATION DES BACTÉRIES ET LEVURES EN CULTURE PURE.

a) *Étalement frais.*

1° L'étalement était fait sur une lame très propre et neuve.

2° La fixation par flambage léger, puis dans le mélange alcool-éther pendant 5 minutes.

3° La coloration était pratiquée :

- soit par l'A.O. à 0,1 % en solution aqueuse : 5 minutes ;
- soit par l'A.O. à 0,01 % dans le tampon pH 6 : 5 minutes ; cette dernière préparée à partir de la solution mère à 0,1 %.

Ces deux méthodes donnant des résultats absolument identiques, nous avons choisi le plus souvent la première pour des raisons de rapidité.

4° La différenciation était effectuée dans le bain de Cl_2Ca (0,1 M) pendant 30 secondes à 1 minute.

5° La préparation était ensuite rincée, montée entre lame et lamelle dans le tampon pH 6.

6° Enfin lutée à la paraffine avant l'examen microscopique.

b) *Coloration vitale : A.O. dans le milieu de culture.*

1° Nous ensemencions la souche à étudier dans un bouillon ordinaire contenant une concentration de 1/5.000 d'A.O., stérilisée par filtration, concentration qui nous est apparue compatible avec un développement bactérien normal .

2° Après 18 heures d'incubation à 37°, nous avons centrifugé et lavé le produit de la pousse, puis pratiqué deux prélèvements :

— le premier placé rapidement entre lame et lamelle et examiné directement sous le microscope ;

— le deuxième fixé par flambage léger avant l'examen.

B. — TECHNIQUE A LA RIBONUCLÉASE.

Après avoir étalé et fixé la préparation par la chaleur, nous l'avons plongée 10 minutes dans une solution aqueuse à 0,005 % de ribonucléase « A », d'activité 50 unités Kunitz/mg (CALBIOCHEM), placée dans un bain-marie maintenu à 45° C.

Nous reprenions ensuite la technique précédente de coloration des étalements frais, à partir de la fixation par l'alcool-éther incluse.

C. — TECHNIQUE DE LA COLORATION DES PRODUITS PATHOLOGIQUES.

Nous avons utilisé la technique de BERTALANFEY [13] modifiée comme suit :

— 1^{er} temps : les frottis secs furent placés 5 minutes dans le mélange alcool-éther 1/1.

— 2^e temps : la réhydratation se faisait par passages successifs de la préparation dans l'alcool à 80°, 70°, 50°, et enfin dans l'eau distillée, la durée de cette opération ne devant pas excéder 1 minute.

— 3^e temps : coloration, rinçage et montage étaient effectués comme précédemment.

D. — LES PHOTOGRAPHIES.

Dans la plupart des cas, elles étaient réalisées à l'objectif à immersion. Les temps de pose variaient de 15 à 40 secondes, selon l'intensité de fluorescence des préparations. Ils se rapprochaient de ceux établis en vue de l'utilisation des films « Ektachrome F » ou « plus X » [149].

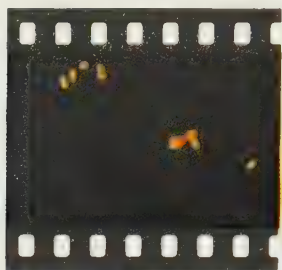


PHOTO n° 1 :

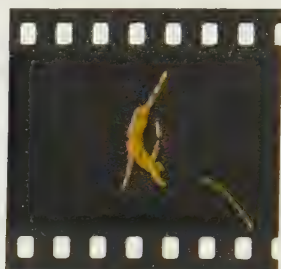


PHOTO n° 2 :

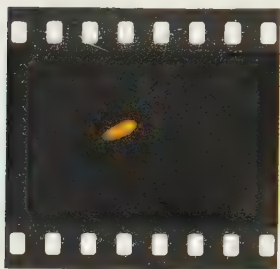


PHOTO n° 3 :

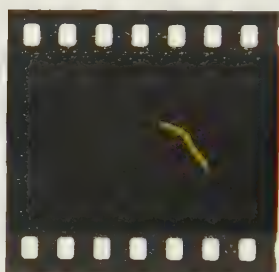


PHOTO n° 4 :

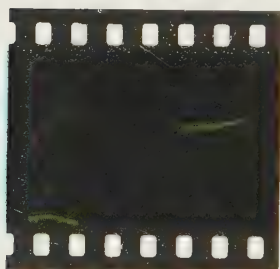


PHOTO n° 5 :

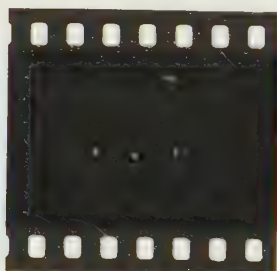


PHOTO n° 6 :

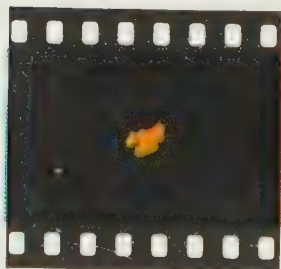


PHOTO n° 7 :

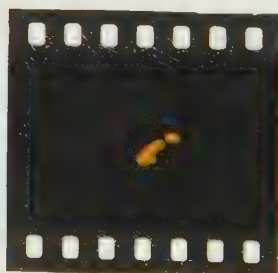


PHOTO n° 8 :

PHOTO n° 1 :

Escherichia coli (souche Monod). Témoin.

— Culture de 6 heures en bouillon ordinaire.

— Cellules en mitoses, importance relative du noyau.

PHOTO n° 2 :

Bacillus subtilis.

— Culture de 24 heures en bouillon ordinaire.

PHOTO n° 3 :

Escherichia coli (souche Monod).

— Culture de 6 heures en bouillon ordinaire en présence de 5 U. de pénicilline G.

— Acridine orange (1/5000) dans le milieu de culture.

— Examen direct : sphéroplastes.

PHOTO n° 4 :

Escherichia coli (souche Monod).

— Culture de 6 heures en bouillon ordinaire contenant 8 U. par ml de pénicilline G.

— Formes longues multinucléées.

PHOTO n° 5 :

Test à la ribonucléase sur *Escherichia coli* (souche Monod).

— Culture de 6 heures en bouillon ordinaire contenant 8 U. par ml de pénicilline G.

— On remarque la disparition de la fluorescence rouge du cytoplasme et par conséquent du RNA, contrastant avec la persistance verte du DNA.

PHOTO n° 6 :

Escherichia coli (souche Monod).

— Culture de 6 heures en présence de 4 mcg/ml de streptomycine - Acridine orange (1/5000) dans le milieu.

— Transformation des bacilles classiques en cocciformes.

PHOTO n° 7 :

Escherichia coli (souche Monod).

— Culture de 6 heures en bouillon ordinaire, en présence de 12,5 mcg/ml de chloramphénicol.

— Présence d'éléments cocciformes où prédomine le DNA et surtout présence d'éléments hypertrophiés bacillaires où domine le RNA.

PHOTO n° 8 :

Staphylococcus aureus (souche Oxford).

— Culture de 6 heures en bouillon ordinaire, en présence de 0,08 mcg/ml d'érythromycine.

— Éléments nettement hypertrophiés où la fluorescence rouge du RNA prédomine sur la fluorescence jaune vert du DNA.

CHAPITRE II

APPLICATION DE LA TECHNIQUE PAR L'ACRIDINE ORANGE A L'ETUDE DES MICROORGANISMES NORMAUX

I. — Les microorganismes.

Nous avons envisagé l'étude systématique de différentes espèces bactériennes en culture pure :

— des COCCI (Streptocoques, Entérocoques, Staphylocoques, Pneumocoques, Gonocoques) ;

— des BACILLES (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*).

Les germes étaient ensemencés, soit sur bouillon ordinaire, soit sur gélose ordinaire, sauf le gonocoque, ensemencé sur milieu spécial, la durée et la température d'incubation étant variables.

En ce qui concerne les LEVURES, nous avons choisi « *Candida Albicans* » cultivé sur sérum de poulain pendant 3 heures à 37° C, réalisant ainsi la filamentisation caractéristique.

Quant à *TREPONEMA PALLIDUM*, la souche Nichols utilisée avait été obtenue d'une orchite expérimentale chez le lapin.

Enfin les PRODUITS PATHOLOGIQUES provenaient de pus d'uréthrite à gonocoques et de cervicite à *Trichomonas vaginalis*.

II. — Les résultats expérimentaux.

A. — COLORATION DES ÉTALEMENTS FRAIS DE CULTURE PURE.

Les résultats furent concordants ; l'action de l'A.O. donnait une fluorescence « jaune ou jaune verdâtre » d'une masse centrale, allongée dans le cas des bacilles, arrondie pour les cocci, correspondant au noyau bactérien riche en D.N.A. Cette coloration de la chromatine nucléaire tranchait sur la coloration « rouge flamboyante » du cytoplasme riche en R.N.A. (photo n° 1 et 2).

Avec les éléments mycéliens de « *Candida albicans* », le noyau vert central contrastait avec le rouge orangé du cytoplasme d'où s'échappaient quelques bourgeons filamenteux.

Par contre, nous n'avons pas obtenu de coloration différentielle avec *Tréponema pallidum*, en dépit des nombreux protocoles expérimentaux utilisés :

— variation des temps de fixation, coloration, différenciation ;

— variation des concentrations des produits.

Mais une coloration rouge nette a été observée en faisant agir pendant 10 minutes une solution aqueuse d'A.O. à 0,001 % dans le milieu de survie de Nelson. Un étalement de ce mélange était légèrement fixé par la chaleur et monté entre lame et lamelle. Etant donné la mobilité des *Tréponèmes*, il fut très difficile d'étudier leur morphologie précise.

B. — ³DANS LES PRODUITS PATHOLOGIQUES, nous avons repéré facilement les « diplocoques intracellulaires » de l'uréthrite à gonocoques. La plupart d'entre eux possédaient une fluorescence différentielle rouge et verte.

Quant au « *Trichomonas vaginalis* », il se présentait sous forme d'une masse ovoïde, « rouge vif », centrée par un énorme noyau « jaune brillant ». Du cytoplasme, s'échappaient des flagelles verdâtres facilement identifiables.

C. — TEST A LA RIBONUCLÉASE.

En faisant agir sur des étalements frais d'*Escherichia coli* la ribonucléase, hydrolysant l'acide ribonucléique, nous avons obtenu l'extinction de la fluorescence rouge du cytoplasme, seule la fluorescence verte du noyau était conservée.

D. — COLORATION VITALE : ACRIDINE DANS LE MILIEU DE CULTURE.

Nous avons obtenu avec *Escherichia coli* une pousse aussi dense que celle des témoins sans acridine orange.

L'examen microscopique, avec ou sans fixation, nous a montré une population microbienne « hétérogène » avec des éléments colorés en vert ou en rouge, mais une majorité présentaient un centre vert ou non coloré et, à la périphérie, un matériel coloré en rouge vif.

Le repiquage de ces colibacilles fluorescents sur milieu exempt d'A.O. a donné naissance à des bactéries morphologiquement normales, mais ayant perdu toute fluorescence.

E. — COLORATION DES BACTÉRIES TUÉES.

En soumettant des cultures de 2 heures et de 4 heures d'*E. coli* et de *Bacillus subtilis* à une ébullition de 15 minutes à 100° C, nous avons observé une fluorescence « gris verdâtre » homogène des bacilles ; ainsi disparaissaient à la fois la coloration rouge du cytoplasme et la coloration verte centrale.

CHAPITRE III

APPLICATION DE LA TECHNIQUE PAR L'ACRIDINE ORANGE A L'ETUDE DES MICRO-ORGANISMES SOU MIS A L'ACTION D'ANTIBIOTIQUES

I. — Matériel et méthodes.

A. — LES MICRO-ORGANISMES étudiés furent *Staphylococcus aureus* (souche Oxford) et *Escherichia coli* (souche Monod).

B. — QUANT AUX ANTIBIOTIQUES, nous avons choisi : la pénicilline G, le chloramphénicol, la tétracycline et la terramycine, l'érythromycine, la streptomycine, la colimycine, la novobiocine, l'adiazine et la furadoïne.

C. — CONDUITE DE L'ÉTUDE.

Nous avons pratiqué deux groupes d'expériences :

— 1. Coloration par la technique habituelle des étalements frais de culture.

— 2. Acridine dans le milieu de culture pour la streptomycine et la pénicilline.

Les doses sub-inhibitrices d'antibiotiques étaient variables.

L'âge des cultures variait de 3 à 6 heures.

II. — Résultats expérimentaux

RESULTATS OBTENUS AVEC LA PENICILLINE

PREMIER GROUPE D'EXPERIENCES

1° ACTION DE LA PENICILLINE SUR ESCHERICHIA COLI (souche Monod).

A. — COLORATION PAR L'ACRIDINE ORANGE DES BACTÉRIES DANS DES FROTTIS EFFECTUÉS A PARTIR DES CULTURES.

1. — Dans les cultures témoins la morphologie bactérienne n'accusait aucune modification après 6 heures de culture.

2. — Les résultats obtenus en fonction de l'âge de la culture d'une part et de la concentration en antibiotique d'autre part ont été consignés dans le tableau 1.

CONDITIONS EXPERIMENTALES		MODIFICATIONS DE LA MORPHOLOGIE				CULTURES TEMOINS
age de la culture	concentration U/ml	formes longues	formes spiralées	formes en cocci	sphéroplastes	formes normales
3 heures	0	0	0	0	0	++++
	4	++++	0	0	0	0
	8	++	++	0	0	0
	20	+++	+	0	0	0
6 heures	0	0	0	0	0	++++
	1	++	0	0	0	0
	2	+++	0	0	0	0
	3	+++	0	+	0	0
	4	+++	0	+	0	0
	5	++++	0	0	0	0
	8	++++	0	0	0	0

Action de la Pénicilline sur la Morphologie d'Escherichia Coli (souche Monod) cultivé en bouillon ordinaire à 37°C.

— Résultats de la coloration par l'Acridine Orange après étalement.

De ce tableau il ressort que :

— La formation de « *sphéroplastes* » n'a pu être obtenue dans les conditions expérimentales indiquées.

— L'aspect en « *cocci* », de fluorescence verte, a été obtenu seulement dans les cultures de 6 heures pour des concentrations en antibiotique de 3 et 4 unités par ml de milieu.

— La forme « *spiralée* » n'a été observée que deux fois dans une culture de 3 heures, en présence de 3 et 20 unités par ml ; à la différence des formes longues classiques, elles présentaient une fluorescence « rouge » homogène.

— La modification la plus constante est essentiellement représentée par un *allongement des bactéries* qui deviennent en outre multinucléées (photo n° 4). On doit souligner que cette modification est d'autant plus fréquente que la culture est plus âgée et la concentration en antibiotique plus importante.

Quelles que soient les conditions expérimentales, la coloration par l'acridine orange présente les mêmes caractères que dans les cultures témoins : noyau de couleur verte et cytoplasme de couleur rouge flamboyant, exception faite pour les « formes spiralées » et les « cocci ».

B. — TEST A LA RIBONUCLÉASE.

Ce test a été effectué sur deux cultures d'*escherichia coli* (souche Monod) de 6 heures, contenant respectivement 4 et 8 unités de pénicilline par ml.

Il a permis de préciser le caractère multinucléé des formes allongées induites par la pénicilline. La culture témoin ne contenait que des « *cocciformes* » *vert intense*, isolés les uns des autres, représentant le noyau bactérien riche en D.N.A. Pour les concentrations de 4 et 8 unités/ml, on observait dans le champ du microscope de longues chaînettes de coloration verte correspondant aux noyaux

bactériens, la coloration rouge cytoplasmique ayant complètement disparu (photo n° 5).

C. — COLORATION DES BACTÉRIES PAR L'ACRIDINE ORANGE, INTRODUITE DIRECTEMENT DANS LA CULTURE MICROBIENNE A LA CONCENTRATION DE 1/5.000.

La culture témoin ne présentait aucune altération de la morphologie et de l'affinité tinctoriale des bactéries.

Deux cultures de 6 heures à 37°C de bouillon ordinaire contenant de l'acridine orange et respectivement 5 et 10 unités de pénicilline par ml. de milieu ont montré des modifications de la morphologie bactérienne. Nous avons observé :

a) Comme précédemment, des *formes allongées* dont le nombre augmentait avec la concentration en antibiotique.

b) La formation de « *sphéroplast*es », énormes masses globuleuses de coloration rouge flamboyante, centrées par un noyau de taille normale de coloration verte (photo n° 3). Leur nombre était sensiblement identique pour les deux concentrations adoptées.

2° ACTION DE LA PENICILLINE SUR STAPHYLOCOCCUS AUREUS (souche Oxford).

Seules ont été examinées des cultures de 6 heures en bouillon ordinaire à 37° C.

La culture témoin n'a donné lieu à aucune remarque. En revanche, les cultures additionnées d'antibiotiques montrèrent une *augmentation très nette du volume des cocci*. La zone nucléaire de couleur verte contrastait avec un cytoplasme très abondant, occupant pratiquement toute la cellule et de coloration rouge flamboyant.

DEUXIEME GROUPE D'EXPERIENCES

RESULTATS OBTENUS AVEC LE CHLORAMPHENICOL

1° ACTION DU CHLORAMPHENICOL SUR ESCHERICHIA COLI (souche Monod).

A. — COLORATION PAR L'ACRIDINE ORANGE DES BACTÉRIES SUR FROTTIS EFFECTUÉS A PARTIR DES CULTURES.

a) *La culture témoin* ne présentait aucune modification notable de la morphologie bactérienne au bout de 6 heures d'incubation à 37° C.

b) *Pour des concentrations de 12,5 mcg par ml* de Milieu, les formes normales étaient encore visibles en nombre relativement important après 3 heures, mais avaient totalement disparu après 6 heures.

— *Au bout de 3 heures*, des bactéries de forme arrondie prédominaient. La coloration à l'acridine orange faisait apparaître une nette *prédominance de la couleur verte*, le R.N.A. réduit à un mince liseré rouge en bordure de la cellule.

— *Au bout de 6 heures*, toutes les bactéries apparaissaient nettement augmentées de volume, mais contrairement à ce que l'on observait dans le cas de la pénicilline, où les rapports entre les deux diamètres bactériens étaient conservés, la coloration à l'acridine orange mettait en évidence la *prédominance de la coloration rouge du R.N.A.* (photo n° 7).

c) *Pour des concentrations de 2,5 mcg/ml* de Milieu, les cultures de 6 heures contenaient des bactéries présentant les mêmes caractères que ceux observés dans les cultures de 3 heures contenant 12,5 mcg/ml d'antibiotique.

B. — CARACTÈRES RÉVERSIBLES DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES INDUITES PAR LE CHLORAMPHÉNICOL.

Une culture sur bouillon ordinaire contenant 12,5 mcg/ml de Milieu a été incubée à la température du laboratoire pendant 30 heures. A ce moment-là,

la coloration à l'acridine orange a permis de mettre en évidence des modifications de la morphologie présentant les mêmes caractères que ceux qui ont été décrits à propos de cultures de 6 heures contenant la même concentration en antibiotique, mais incubées à 37° C :

— Arrondissement des éléments avec augmentation de volume et nette prédominance du R.N.A.

— Le repiquage en bouillon ordinaire, sans addition de chloramphénicol, a permis d'observer après 6 heures d'étuve à 37° des *bactéries de morphologie normale* et présentant après coloration à l'acridine orange des aspects identiques à ceux qui sont retrouvés couramment dans toutes les cultures témoins.

2° ACTION DU CHLORAMPHENICOL SUR STAPHYLOCOCCUS AUREUS (Souche Oxford).

Pour une concentration de 1,25 mcg/ml, des cultures en bouillon ordinaire, incubées à 37° C, montraient au bout de 6 heures un nombre important de cocci nettement augmentés de volume avec prédominance de la fluorescence rouge.

TROISIEME GROUPE D'EXPERIENCES

RESULTATS OBTENUS AVEC LES TETRACYCLINES ET L'ERYTHROMYCINE

1° ACTION DE LA TETRACYCLINE SUR ESCHERICHIA COLI (souche Monod).

Les cultures ont été comme précédemment réalisées en bouillon ordinaire et incubées à 37° C.

La culture témoin au bout de 6 heures ne montrait aucune altération de la morphologie des bactéries.

L'addition au milieu de tétracycline entraînait des modifications de la morphologie variables selon les concentrations.

— Pour une concentration de 1 mcg/ml, l'aspect des bactéries était strictement comparable à celui observé dans les cultures témoins.

— Pour une concentration de 10 mcg/ml, les bactéries apparaissaient *arrondies* comme dans le cas des bactéries soumises à 12,5 mcg/ml de chloramphénicol pendant 3 heures ou 2,5 mcg/ml pendant 6 heures. C'est également la *fluorescence verte qui prédominait* largement.

— Pour une concentration de 15 mcg/ml de milieu, on observait une augmentation globale de la taille des bactéries, comme dans le cas des bactéries soumises pendant 6 heures à 12,5 mcg/ml de chloramphénicol. C'est la *fluorescence rouge qui prédominait*.

2° ACTION DE LA TERRAMYCINE ET DE L'ERYTHROMYCINE SUR LE STAPHYLOCOCCUS AUREUS (souche Oxford).

Comparés avec la culture témoin, les cocci cultivés en bouillon ordinaire, additionné de 0,75 mcg/ml de milieu de terramycine, apparaissaient au bout de 6 heures d'étuve à 37° C nettement *augmentés de volume*. La *fluorescence rouge vif l'emportait sur la verte*.

Il en est de même avec des cultures contenant 0,08 mcg/ml d'érythromycine (photo n° 8).

QUATRIEME GROUPE D'EXPERIENCES

RESULTATS OBTENUS AVEC LA STREPTOMYCINE

1° ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR ESCHERICHIA COLI.

Trois souches d'*Escherichia coli* ont été utilisées:

— l'une sensible à la streptomycine,

— les deux autres résistantes à des doses différentes de streptomycine.

A. — *ESCHERICHIA COLI* (SOUCHE MONOD) SENSIBLE A LA STREPTOMYCINE.

Les cultures témoins en bouillon ordinaire, examinées après 3 et 6 heures d'incubation à 37° C, montraient des bactéries de morphologie normale.

Des cultures en bouillon ordinaire contenant respectivement 4 mcg, 10 mcg, 20 mcg de streptomycine par ml de milieu montraient au bout de 3 heures d'incubation à 37° C une disparition totale des éléments d'aspect normal qui cédaient la place à des *éléments cocciformes* où l'acridine orange faisait apparaître une *fluorescence verte prédominante*. Des formes allongées et multinucléées n'ont jamais été observées.

Des cultures en bouillon ordinaire, contenant respectivement 7 mcg, 16 mcg, 17,5 mcg de streptomycine par ml, montraient après 6 heures d'incubation à 37° C les phénomènes suivants:

— Augmentation du nombre des éléments cocciformes, particulièrement nette pour des concentrations de 16 et 17,5 mcg/ml avec large prédominance du D.N.A.

— Présence de quelques formes allongées multinucléées à la concentration de 16 mcg/ml.

L'addition d'acridine orange dans une culture d'*Escherichia coli* (souche Monod) contenant 4 mcg de streptomycine par ml montrait après incubation à 37° C pendant 6 heures, à côté des formes normales, un nombre important d'éléments cocciformes riches en D.N.A., ainsi qu'en témoignait l'importante fluorescence verte qui contrastait avec la fluorescence rouge du R.N.A. réduite à un mince liseré rouge vif (photo n° 6).

Le repiquage d'une culture de 6 heures contenant 17,5 mcg par ml dans un bouillon ordinaire exempt d'antibiotique et incubée 30 heures à la température du laboratoire montrait de très nombreux éléments discrètement allongés, renflés aux deux extrémités en haltères, souvent disposés en courtes chaînettes. La coloration par

l'acridine orange précisait que le D.N.A. était présent dans les deux renflements distaux, le R.N.A. étant localisé au niveau de la partie centrale.

B. — *ESCHERICHIA COLI* RÉSISTANT A 100 MCG DE STREPTOMYCINE.

Après 6 heures de culture en bouillon ordinaire à 37° C, aucune modification de la morphologie n'a pu être obtenue avec des concentrations de 10 mcg, 20 mcg, 25 mcg, 50 et 100 mcg par ml. La coloration de ces éléments par l'acridine orange fournissait des résultats identiques à ceux des cultures témoins.

C. — *ESCHERICHIA COLI* RÉSISTANT A 350 MCG DE STREPTOMYCINE.

Par rapport à la culture témoin qui ne contenait au bout de 6 heures à 37° C que des éléments de forme et de coloration normales, nous avons observé uniquement des éléments *cocciformes* présentant une *fluorescence verte* intense ; ces phénomènes ont été retrouvés pour toutes les concentrations utilisées : 25 mcg, 50 mcg, 75mcg, 100 mcg, 150 mcg, 200 mcg de streptomycine par ml de milieu.

2° ACTION DE LA STREPTOMYCINE SUR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (souche Oxford).

Aucune modification tant de la morphologie que de la fluorescence après coloration par l'acridine orange n'a pu être observée avec les concentrations suivantes : 0,20 mcg, 0,25 mcg, 0,40 mcg de streptomycine par ml de milieu.

CINQUIEME GROUPE D'EXPERIENCES

RESULTATS OBTENUS AVEC LA COLIMYCINE

L'antibiotique utilisé à la dose de 0,1 mcg/ml entraînait chez *Escherichia coli* (souche Monod), après 3 heures et 6 heures à 37° C, des modifications strictement identiques

à celles qui ont été décrites à propos de la streptomycine vis-à-vis de la même souche.

SIXIEME GROUPE D'EXPERIENCES

RESULTATS OBTENUS AVEC LA NOVOBIOCINE

L'antibiotique utilisé à la dose de 0,35 mcg/ml de bouillon ordinaire ne faisait apparaître aucune modification dans le comportement d'*Escherichia coli*, même après 6 heures d'incubation à 37° C.

Pour les concentrations de 14 mcg/ml et 28 mcg/ml, des altérations se manifestaient seulement après 6 heures à 37° C, les éléments normaux faisaient défaut ; ils étaient remplacés par des éléments *cocciformes* présentant une *fluorescence verte* très largement prédominante sur la rouge.

SEPTIEME GROUPE D'EXPERIENCES

RESULTATS OBTENUS AVEC LA FURADOINE ET L'ADIAZINE

A. — ACTION SUR *ESCHERICHIA COLI* (souche Monod).

Quelle que soit la drogue utilisée, aucune modification morphologique n'était perceptible après 3 heures d'incubation à 37° C.

Au bout de 6 heures, en revanche, des altérations se manifestaient :

— avec la furadoïne, pour une concentration de 1 disque (Institut Pasteur) par ml de milieu, on notait une *augmentation* globale du volume d'*Escherichia coli* (souche Monod) sans modification apparente du rapport D.N.A./R.N.A. ;

— avec l'adiazine, pour des concentrations de 1 et 2 disques (Institut Pasteur) par ml de milieu, *Escherichia coli* apparaissait sous forme d'*éléments arrondis* dans lesquels la *fluorescence verte* prédominait.

B. — ACTION SUR LE STAPHYLOCOCCUS AUREUS
(souche Oxford).

Aucune modification de la morphologie ne s'est manifestée, quelque'ait été le produit utilisé aux concentrations adoptées pour *Escherichia coli*.

CHAPITRE IV

MYCOBACTERIES ET COLORATION PAR L'ACRIDINE ORANGE

Tous les résultats qui précèdent, en ce qui concerne la morphologie normale des bactéries ainsi que les modifications apportées par l'action antibiotique, nous ont fait aborder l'étude des mycobactéries au moyen de la coloration par l'acridine orange.

Nous pouvions espérer retrouver des différences morphologiques, d'une part entre les bacilles tuberculeux humains et les autres mycobactéries, d'autre part entre les bacilles tuberculeux normaux et les bacilles modifiés par la thérapeutique antibiotique. Ce travail est actuellement en cours et il serait prématuré de conclure aujourd'hui. Cependant des résultats intéressants ont déjà été obtenus.

Les mycobactéries sont malheureusement très difficiles à colorer par la technique à l'acridine orange comme par les autres méthodes. On n'obtient souvent qu'une coloration verdâtre, homogène et une technique particulière doit être utilisée, comportant des temps plus longs de fixation et de coloration.

Sur des étalements de culture pure nous avons pu ainsi observer des éléments différenciés avec un filament jaune vif, tranchant sur la périphérie rougeâtre sans obtenir cependant le même contraste qu'avec les eubactéries. Mais ce résultat est excellent, puisque les méthodes cytochimiques de coloration sont dans le cas des mycobactéries

particulièrement délicates et donnent des résultats discutés.

Mais il serait imprudent d'affirmer que les images obtenues avec l'acridine orange correspondent bien au noyau des mycobactéries, étant donné leur structure particulière. L'existence de granulations métachromatiques comme la richesse des constituants lipidiques peut modifier les résultats de coloration.

Des différences morphologiques ont déjà été signalées entre le bacille tuberculeux et les mycobactéries atypiques. Elles sont particulièrement bien observées avec l'acridine.

Par exemple, *Mycobacterium aquae* se présente sous l'aspect de petites masses cocciformes, tandis que *Mycobacterium Kansaii*, au contraire, est un bacille volumineux et dont la coloration différentielle est particulièrement nette, tandis qu'il n'en est pas de même avec le B.K.

Enfin, l'observation de souches résistantes cultivées en présence de concentrations infra-bactériostatiques d'antibiotiques (streptomycine, cyclosérine, P.A.S.) nous a montré certaines altérations morphologiques qui devront être confirmées : par exemple, une coloration rouge intense avec la streptomycine, des germes petits et verdâtres avec la cyclosérine et le P.A.S.

Notre travail a porté non seulement sur des cultures, mais aussi sur des expectorations de tuberculeux que nous avons colorées comparativement par l'acridine et la méthode de Ziehl. Nous avons dû employer une méthode de décoloration par l'acide acétique dilué et l'alcool pour ne conserver que la fluorescence des éléments acido-alcoolo-résistants. L'extinction de la fluorescence du fond de la préparation a été obtenue par le violet de gentiane. Un autre fluorochrome, l'Auramine, est utilisé couramment pour colorer les B.K., avec une méthode analogue, mais cette dernière ne donne pas de coloration différentielle des acides nucléiques, mais sa fluorescence obtenue est plus intense et plus stable dans le temps.

Cependant la coloration par l'acridine orange pourrait être intéressante en pratique, si l'on retrouve dans les expectorations des différences morphologiques entre les bacilles sensibles et les bacilles résistants aux antibiotiques. Une telle indication, grossière certes, mais immédiate, pourrait rendre de très grands services aux thérapeutes.

CHAPITRE V

DISCUSSION

I. — Valeur de la méthode utilisée :

Données fournies par l'étude des microorganismes normaux.

a) SUR LE PLAN DE LA MORPHOLOGIE NORMALE DES BACTÉRIES en culture pure après étalement, avec la technique choisie, l'A.O. s'est révélée comme un excellent colorant fluorescent.

1° Tout d'abord elle *conserve la morphologie normale* des germes et permet, par son extrême sensibilité, de mettre en évidence de façon rapide et simple noyau et cytoplasme bactériens. En effet, dans les conditions expérimentales choisies, le complexe A.O.-D.N.A. donnait toujours une fluorescence dans le « vert », et le complexe A.O.-R.N.A. dans le « rouge orangé ».

2° *Le test à la ribonucléase* pratiqué a éliminé toute cause d'erreurs concernant la coloration des mucopolysaccharides.

b) LA COLORATION VITALE s'est aussi montrée valable et intéressante. La concentration de 1/5.000 d'A.O. par ml de milieu n'a pas eu à première vue une influence toxique marquée sur les cellules bactériennes étudiées. En effet, la plupart des germes présentaient la fluorescence différentielle du noyau et du cytoplasme. Il faut bien reconnaître cependant qu'à cette concentration d'A.O., certains colibacilles présentaient une fluorescence entièrement

« verte » et d'autres entièrement « rouge ». Cette non-homogénéité nous amène à poser plusieurs questions : était-ce le résultat de l'action toxique et mutagène de l'A.O. ? Les colibacilles avaient-ils une sensibilité particulière à l'A.O. ou aux ultra-violets ? Autant de problèmes qu'il nous resterait à résoudre.

c)) Les questions précédentes nous font aborder le sujet des BACTÉRIES TUÉES. Nous avons vu combien il était controversé dans la littérature. Pour la majorité des auteurs, les germes tués donnent une fluorescence rouge homogène ; pour d'autres, cette fluorescence est soit rouge, soit verte, compte tenu des conditions techniques.

Nos résultats montrent que toutes les bactéries tuées par la chaleur étaient, après coloration, d'un *vert homogène*, mais cette fluorescence était *peu intense*.

Comment donner une explication à ces résultats ?

Comme nous avons pu le voir, si la littérature s'est montrée prodigue quant à l'explication de la fluorescence rouge des cellules tuées, due principalement à des modifications du D.N.A., il n'en est pas de même au sujet de leur fluorescence verte.

En ce qui nous concerne, nous proposons deux hypothèses que nous ne pouvons pas confirmer pour le moment ; hypothèses en rapport avec les données de la littérature faisant état d'une fluorescence verte tenant aux conditions techniques.

1° En effet, nous avons vu que le pH et l'état métabolique de la cellule sont interdépendants pour influencer le temps de pénétration du colorant. Il ne fait aucun doute que l'ébullition des bactéries modifie notablement ces paramètres et, par conséquent, la pénétration ou la concentration des molécules d'A.O. à l'intérieur des bactéries.

De plus, l'ébullition, perturbant de façon importante la synthèse protéique, doit modifier la teneur et la répartition des polynucléotides bactériens et entraver ainsi la liaison A.O.-acides nucléiques.

La fluorescence verte observée serait le reflet de la seule formation du complexe II avec les acides nucléiques, c'est-à-dire que le rapport des molécules d'A.O. serait très faible par rapport à celui des nucléotides. Le complexe I ne pouvant se réaliser, le mélange des complexes I et II, spécifique du R.N.A., n'apparaîtrait pas, d'où absence de fluorescence rouge.

2° Néanmoins, nous pouvons nous demander si cette fluorescence verte des bactéries tuées n'est pas le résultat de caractères propres à la fluorescence obtenue avec l'A.O., notamment fugacité, altération dans le temps et sous lumière ultra-violette, altérations que nous avons constatées. Ces caractères opposeraient ainsi cette fluorescence de l'A.O. à celle provoquée par d'autres fluorochromes. Ce sujet mériterait à lui seul une étude particulière.

d) Le domaine des PRODUITS PATHOLOGIQUES étudiés a donné des réponses valables sur le plan général ; en effet, les germes étaient toujours visibles. Mais pourquoi la coloration différentielle des gonocoques extra-cellulaires était obtenue facilement, alors que celle des gonocoques intra-cellulaires ne l'était pas ou était difficile à percevoir ?

L'état métabolique de ces germes intra-cellulaires était-il modifié ? Le pH et la teneur ionique des cellules avaient-ils perturbé la pénétration du colorant à l'intérieur des gonocoques ? De toute façon, dans ce cas encore, tout n'est pas résolu à l'heure actuelle.

II. — Analyse des résultats obtenus avec les antibiotiques.

A. — AVEC LA PENICILLINE

a) COLORATION DE BACTÉRIES GRAM NÉGATIF : *ESCHERICHIA COLI*.

1° Nous avons obtenu les *formes longues multinucléées* dont le nombre et la taille augmentaient avec la concentration en antibiotique.

Néanmoins, la durée d'action de la pénicilline ne semblait pas influencer l'importance de ces modifications morphologiques. En effet, après 3 heures de culture, en présence de 8 unités par ml, nous avons observé des formes hyper-longues, de fluorescence intense rouge, spiralées, déjà signalées au microscope à contraste de phase par FLEMING [28], tandis qu'à la 6^e heure, avec la même concentration de pénicilline, ces formes n'étaient pas visibles.

2° Quant aux *cocciformes* obtenus dans les cultures de 6 heures en présence de 3 et 4 unités par ml de pénicilline, ils pourraient représenter des formes L. En effet, leur fluorescence verte intense, spécifique du D.N.A., serait peut-être le reflet de micro-colonies décrites par TULASNE à propos de l'action de la pénicilline sur *Proteus vulgaris* [98] ; micro-colonies formées par l'amas des granulations désoxyribonucléiques issues des sphéroplastes. En ce qui nous concerne, les sphéroplastes n'ont été obtenus que par la seule technique de l'A.O. dans le milieu de culture, montrant ainsi que la méthode des étalements et coloration ultérieure était traumatisante pour des corps fragiles et permettait ainsi de libérer les granulations de D.N.A. à l'origine des micro-colonies.

b) COLORATION DE COCCI GRAM POSITIF : STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Les germes étaient dans tous les cas *augmentés de volume*, mais nous n'avons observé ni formes en bâtonnet, ni formation de chaînettes.

c) A partir de ces constatations nous pouvons essayer d'établir un RAPPROCHEMENT AVEC LES DONNÉES DE LA BIOCHIMIE apportées par la littérature, à la fois en ce qui concerne l'action de la pénicilline sur les bactéries et les mécanismes de liaison de l'A.O. avec les acides nucléiques.

1° En effet nous avons vu que l'action essentielle de la pénicilline était de modifier la synthèse de la paroi bactérienne sans intervenir, tout au moins au début de son action, dans la synthèse protéique interne des germes.

Pour notre part, nous n'avons pas observé de modifications de la fluorescence rouge du R.N.A. et de la fluorescence verte du D.N.A., par rapport aux témoins, chez les bactéries augmentées de taille, multinucléées (mis à part les formes spiralées).

Nous pouvons en déduire que la liaison A.O.-acides nucléiques se fait normalement chez les germes soumis à l'action de la pénicilline. La pénétration du colorant est donc facile, et le rapport du nombre des molécules d'acides nucléiques est, par rapport à celles du colorant, assez élevé pour permettre la formation des complexes I et II de l'A.O. avec les polynucléotides ; le complexe II étant spécifique du D.N.A., le mélange des complexes I et II du R.N.A.

2° Mais comment expliquer la fluorescence rouge homogène des formes longues spiralées ?

Deux hypothèses peuvent être envisagées :

— Les altérations de la paroi des colibacilles sont telles qu'une pénétration massive des cations d'A.O. à l'intérieur des cellules se produirait et la fluorescence propre de ces cations masquerait celle des complexes A.O.-acides nucléiques.

— Nous pouvons considérer aussi que ces formes spiralées sont des formes mortes auxquelles s'appliquerait l'explication biochimique de l'effet Strugger, par la dénaturation du D.N.A. Cette deuxième hypothèse serait appuyée par les travaux effectués au microscope électronique, montrant des altérations de la chromatine nucléaire sous l'action de la pénicilline.

B. — AVEC LE CHLORAMPHENICOL ET LE GROUPE DES TETRACYCLINES

a) Avec le CHLORAMPHÉNICOL nous avons obtenu chez *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* des germes augmentés de volume où la fluorescence rouge dominait, mais cela seulement dans les cultures de 6 heures en

présence de cet antibiotique. En effet, nous avons observé deux phénomènes dans l'action du chloramphénicol sur *Escherichia coli* :

1° Des *cocciformes* vert intense, cernés d'un mince liseré rouge, étaient visibles, soit dans les cultures de 3 heures additionnées d'une concentration de chloramphénicol proche de la dose bactériostatique (12,5 mcg/ml), soit dans les cultures de 6 heures où la concentration d'antibiotique était très faible (2,5 mcg/ml).

2° Dans les cultures de 6 heures, les *formes augmentées de volume* où la *fluorescence rouge* dominait apparaissaient avec la concentration de 12,5 mcg/ml.

b) Avec le GROUPE DES TÉTRACYCLINES (tétracycline et terramycine), des phénomènes *identiques* furent constatés.

c)) Nous avons vu que L'ACTION BIOCHIMIQUE du chloramphénicol et des tétracyclines a pour caractéristique essentielle de perturber les synthèses protéiques internes des bactéries, en interférant dans les processus de phosphorylation. Des études plus précises effectuées avec le chloramphénicol ont établi qu'il présidait à la formation d'un néo-R.N.A., de poids moléculaire inférieur à celui du R.N.A. normal. Essayons d'expliquer nos résultats à la lueur de ces données, ainsi qu'à celle fournie par la biochimie concernant la liaison A.O.-acides nucléiques.

1° Dans les *cocciformes*, la formation des complexes I et II existe, mais semble perturbée, le complexe II spécifique du D.N.A. apparaît normal, cerné par un mince liseré rouge, reflet du mélange des complexes I et II spécifique du R.N.A. Dans ce dernier cas :

— ou bien le cytoplasme est réduit à ce liseré rouge, ce qui semble peu probable, la littérature ne mentionnant pas de diminution de taille des bactéries sous l'influence du chloramphénicol et des tétracyclines ;

— ou l'hypothèse la plus vraisemblable que nous soulevons serait une difficulté de formation du complexe I (ou du mélange des complexes I et II) à la périphérie de

la cellule bactérienne. Les perturbations métaboliques empêchent une pénétration, une concentration ou une liaison suffisante des molécules d'A.O. à l'intérieur de la bactérie.

2° Quant aux *colibacilles augmentés de volume où la fluorescence rouge domine*, tout au moins en ce qui concerne le chloramphénicol, ils seraient les témoins d'un nouvel équilibre métabolique de la bactérie, expliquant l'apparition du mélange des complexes I et II spécifiques du R.N.A. néo-formé. La fixation serait d'autant plus facilitée par le faible poids moléculaire de ce nouveau R.N.A. D'ailleurs nos expériences de repiquage sur milieu sans antibiotique ont prouvé que les bactéries soumises à des concentrations sub-bactériostatiques de chloramphénicol pouvaient retrouver un métabolisme normal, la coloration différentielle classique réapparaissant.

C. — AVEC L'ÉRYTHROMYCINE ET LA FURADOINE

1° Avec des concentrations sub-inhibitrices d'ÉRYTHROMYCINE, proche de la dose bactériologique, les germes sensibles ont montré une augmentation de taille avec prédominance de la fluorescence rouge. Ces résultats sont bien entendu à rapprocher de ceux obtenus avec le chloramphénicol et les tétracyclines, le mode d'action de l'érythromycine étant identique à celui de ces derniers.

2° En ce qui concerne la FURADOINE, nous avons observé les mêmes modifications, mais nous ne pouvons avancer aucune explication de ces phénomènes, le mode d'action de ce produit ne paraissant pas élucidé à l'heure actuelle.

D. — AVEC LA STREPTOMYCINE ET L'ADIAZINE

1° Les germes se présentaient sous l'action de la STREPTOMYCINE sous forme de *cocci vert intense avec perte presque totale de la fluorescence rouge péri-nucléaire*. Ces éléments ressemblaient en tout point à ceux observés au premier temps d'action du chloramphénicol et des tétracyclines. Cependant une différence existait, puisque,

quelle que soit la concentration de streptomycine, il n'apparaissait aucune forme augmentée de volume avec fluorescence rouge prédominante.

Donc, quand nous connaissons les perturbations qu'entraîne la streptomycine sur les synthèses protéiques internes et la perméabilité de la membrane cytoplasmique des bactéries, nous pouvons en déduire que l'état métabolique des cellules est compromis, expliquant la formation défectueuse du complexe I (ou du mélange des complexes I et II). Ici encore l'hypothèse selon laquelle ces cocciformes représenteraient des bactéries diminuées de volume ne cadrerait pas avec les données de la littérature.

2° Avec l'ADIAZINE, sulfamide perturbant lui aussi la synthèse des protéines, les résultats et par conséquent les hypothèses sont identiques à ceux obtenus avec la streptomycine.

E. — AVEC LA NOVOBIOCINE ET LA COLIMYCINE

Avec la novobiocine nous n'avons retrouvé ni la filamentation des colibacilles, ni leur agglomération, connaissant l'action élective de la colimycine et de la novobiocine sur la perméabilité de la membrane cytoplasmique et nos résultats montrant comme dans le cas de la streptomycine et de l'adiazine des cocciformes vert intense où la fluorescence rouge avait pratiquement disparu.

Il nous est permis de soulever l'hypothèse selon laquelle la perméabilité aux molécules d'A.O. de la cellule serait perturbée au point d'empêcher la formation du complexe I (ou du mélange des complexes I et II) et ceci de façon définitive.

..

L'analyse de nos résultats fait donc apparaître que seule la pénicilline ne perturbe pratiquement jamais la formation des complexes I et II de l'A.O. avec les acides nucléiques.

Avec tous les autres antibiotiques, le mélange des complexes I et II spécifique du R.N.A. semble altéré :

— modifications réversibles en ce qui concerne le chloramphénicol et les tétracyclines, et peut-être pour l'érythromycine et la furadoïne ;

— modifications irréversibles pour la streptomycine et l'adiazine d'une part, la novobiocine et la colimycine d'autre part.

Ces antibiotiques ont pour facteur commun de modifier l'état métabolique des bactéries en intervenant dans les synthèses protéiques internes et en plus, pour certains (novobiocine, colimycine, streptomycine), de modifier la perméabilité de la membrane cytoplasmique. Toutes ces modifications expliqueraient les difficultés de pénétration, de concentration ou de liaison des molécules d'A.O. à l'intérieur des bactéries. Ces perturbations affecteraient principalement la mise en évidence du R.N.A., lequel ne peut donner une fluorescence rouge qu'après formation du mélange des complexes I et II. Par contre, le complexe II spécifique du D.N.A. semble apparaître dans tous les cas, peu de molécules d'A.O. étant nécessaires à sa formation, à la différence du complexe I qui nécessite pour sa formation une quantité suffisante de molécules d'A.O.

REMARQUES.

Nous devons cependant émettre une réserve en ce qui concerne la fluorescence rouge minime périnucléaire observée chez les cocciformes. En effet, les discussions sont basées sur le fait biochimique essentiel selon lequel la fluorescence rouge est le reflet du mélange des complexes I et II spécifique du R.N.A. Il ne faut néanmoins pas perdre de vue qu'une seule spire du D.N.A. peut donner avec l'A.O. une fluorescence rouge, et ce liseré rouge pourrait être l'image d'une partie de D.N.A. dénaturé par l'action antibiotique.

Il est bien évident que *toutes ces hypothèses mériteraient une étude confirmative ou infirmative par les procédés de la biochimie et de la spectrophotométrie*. Cependant nos résultats laissent entrevoir les perspectives de la coloration par l'A.O. en Bactériologie dans les domaines de la recherche, et peut-être dans celui de la pratique courante.

III. — Perspectives de la coloration par l'acridine orange en bactériologie.

A. — DANS LE DOMAINE DE LA RECHERCHE

1° Cette coloration par l'A.O. permet ainsi une CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES TESTÉS, basée à la fois sur les données de la biochimie et sur les altérations morphologiques observées chez les bactéries soumises à des doses sub-inhibitrices d'antibiotique, pendant 6 heures sur B.O. à 37° C (Tableau N° 3).

UN GROUPE I, composé essentiellement de la *pénicilline* agissant principalement sur la *paroi bactérienne*. Elle induit des formes allongées ou gonflées, mais où la coloration différentielle des deux acides nucléiques est conservée.

UN GROUPE II, composé de tous les *anti-bactériens* dont *l'action principale est une inhibition de la synthèse des protéines*. Des faibles concentrations sub-inhibitrices provoquent l'apparition de cocciformes verts entourés d'un mince liseré rouge. Dans ce groupe nous devons cependant distinguer deux sous-groupes A et B.

— LE SOUS-GROUPE A comprend les anti-bactériens qui provoquent, avec de *fortes concentrations sub-inhibitrices*, l'apparition de *formes augmentées de volume* où la *fluorescence rouge cytoplasmique prédomine*. Ceci correspondrait bien aux données de la biochimie selon lesquelles, tout au moins en ce qui concerne le chloramphénicol, une synthèse de néo-R.N.A. succéderait à l'inhibition de la synthèse protéique.

— LE SOUS-GROUPE B comprend les antibiotiques provoquant avec de *fortes concentrations sub-inhibitrices* les mêmes cocciformes verts décrits à propos des faibles concentrations. Tous les antibiotiques classés dans ce sous-groupe (en dehors de l'adiazine) ont comme facteur commun d'altérer la *perméabilité de la membrane cytoplasmique* en plus de la synthèse des protéines.

Notre essai de classification s'éloigne des autres classifications faites en partant de critères différents, notamment celle de MATSUMAE et HATA [77], dont nous résumons les travaux dans le tableau n° 2, et celle, peu différente, de KAMIJO [54]. Ces auteurs ont utilisé uniquement la coloration par le Giemsa et les altérations morphologiques décrites étaient en fait des altérations de groupement des germes entre eux plutôt que des modifications des bacilles eux-mêmes.

Groupes	Caractère principal	Types	Changements morphologiques	Antibiotiques
I	Elongation et Filaments	A	filaments	PENICILLINE
		B	filaments et agglomération	NOVOBIOCINE P.A.S sulfalisomizine
		C	filaments avec courbes	Dérivés de l'auréothricine
II	Agglomération	D	Agglomération de 5 à 6 cellules en "rosace"	leucomycine oléandomycine ERYTHROMYCINE carbomycine spiramycine bacitracine oxytétracycline chlortétracycline
		E	Agglomération	CHLORAMPHENICOL STREPTOMYCINE TETRACYCLINE POLYMYXINE cérulénine nystatine kanamycine
III	pas de changements	F	pas de changements	0

Classification des Antibiotiques en fonction des changements morphologiques obtenus chez E. Coli B.
— Étalements de cultures de 5 heures à 27° C, en bouillon ordinaire, en présence de concentrations d'antibiotiques suffisantes pour provoquer un changement morphologique. — Coloration par le Giemsa après étalement. — Examen au Microscope ordinaire (grossissement 400 à 600 fois).
— Selon Matsumae et Hata (77).

ANTIBIOTIQUES TESTES	ALTERATIONS BIOCHIMIQUES					ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES		CLASSIFICATION		GERMES TESTS	
	modifications de la synthèse de la paroi bactérienne	modifications de la perméabilité de la membrane cytoplasmique	inhibition de la synthèse protéique	modifications de la synthèse des acides nucléiques		forte concentr. sub-inhib.	forte concentr. sub-inhib.	Groupes	Sous Groupes	E. Coli	Staph. Aureus
				DNA	RNA						
PENICILLINE	e.p. e.s.					formes allongées ou gonflées multinucléées		I		+	+
CHLORAMPHENICOL	e.p. e.s.		++	++	excitation transitoire inhibition	cocciformes où la fluorescence verte domine	formes augmentées de volume où la fluorescence rouge domine	II	A	+	+
Groupe des TETRACYCLINES	e.p. e.s.		++	++	inhibition					+	+
ERYTHROMYCINE	e.p. e.s.		++	++	inhibition					+	+
FURADOINE	e.p. e.s.				++ + ?					+	
STREPTOMYCINE	e.p. e.s.	++ +	++ +	++ +	excitation transitoire ? inhibition	cocciformes où la fluorescence verte domine	cocciformes où la fluorescence verte domine	B		+	+
SULFAMIDE Adiazine	e.p. e.s.		++ +	++ +	inhibition					+	+
COLIMYCINE	e.p. e.s.	++ +		++ +	inhibition					+	+
NOVOBIOCINE	e.p. e.s.	++ + ?	++ +	++ +	inhibition					+	+

Essai de classification des Antibiotiques testés, en fonction du rapprochement altérations Biochimiques.

— Altérations morphologiques observées après coloration par l'Acridine Orange chez E. Coli et Staph Aureus.

e. p. : Effet Principal

e. s. : Effets Secondaires.

2° L'examen du tableau n° 3 montre que les différences morphologiques observées après coloration par l'A.O. permettent un RAPPROCHEMENT ET MÊME UNE LIAISON AVEC LES DONNÉES DE LA BIOCHIMIE concernant l'action des antibiotiques sur les bactéries, qu'elles soient Gram négatif (*Escherichia coli*), ou Gram positif (*Staphylococcus aureus*).

B. — DANS LE DOMAINE DE LA PRATIQUE COURANTE

Certains auteurs ont étudié les isothermes d'adsorption de l'A.O. sur différents germes et, comme la plupart des antibiotiques agissent sur les synthèses des acides nucléiques, il est vraisemblable que ces isothermes d'adsorption de l'A.O. chez les bactéries soumises à l'action des antibiotiques seront modifiés. Leur étude permettrait ainsi de mettre en évidence des modifications spécifiques, et nous pouvons nous demander si elle ne pourrait pas être à la base d'un antibiogramme quantitatif.

CONCLUSIONS

La revue de la littérature que nous avons effectuée, nous a amené à conclure que l'Acridine Orange pouvait être une coloration intéressante en Bactériologie. Nous avons pris connaissance des causes d'erreurs et des limites qui accompagnent cette méthode. La fluorescence verte est spécifique du D.N.A. (à double spire) tandis que la fluorescence rouge peut représenter soit le R.N.A. soit le D.N.A. mono-caténaire. Les causes d'erreurs liées à la fluorescence rouge des mucopolysaccharides et des cations d'Acridine orange eux-mêmes, peuvent être supprimées par certains moyens techniques (Ribonucléase, action des Sels).

Ces données nous ont conduit à rechercher une technique de coloration différentielle et directe par l'Acridine orange, facile à exécuter pour étudier la morphologie normale de bactéries de différentes espèces aussi bien dans les cultures pures que dans les produits pathologiques. Notre technique s'est avérée valable ; dans tous les cas, nous avons obtenu une coloration différentielle des acides nucléiques. Quant aux bactéries tuées par la chaleur, elles présentaient une fluorescence homogène gris-verdâtre.

Nous avons repris l'étude des altérations morphologiques des bactéries (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) soumises à l'action de divers antibiotiques, la littérature ne mentionnant pas d'études conduites avec la méthode par l'Acridine orange en Fluorescence.

L'analyse de nos résultats nous a amené aux conclusions suivantes :

1 — Les anomalies morphologiques dues à l'action des antibiotiques sur les bactéries sont bien mises en évidence

par la coloration à l'Acridine orange, nous permettant de distinguer :

- soit des éléments allongés filamenteux,
- soit des bactéries apparaissant de taille réduite,
- soit des bactéries hypertrophiées globalement.

2 — La coloration nous a montré que sous l'influence des antibiotiques on observait des modifications de la répartition du D.N.A. et du R.N.A. Analysant les travaux effectués sur les modalités Biochimiques d'action des antibiotiques nous avons constaté un certain parallélisme entre nos observations et ce qui est rapporté dans la littérature.

3 — Ce rapprochement nous a conduit à une classification des antibiotiques testés comprenant :

— Un groupe I : composé essentiellement de la pénicilline qui agit principalement sur la paroi bactérienne et induit des formes allongées ou gonflées, mais où la coloration différentielle des acides nucléiques est conservée.

— Un groupe II composé de tous les antibactériens dont l'action principale est une inhibition de la synthèse des protéines :

a) de faibles concentrations sub-inhibitrices provoquent l'apparition de cocciformes verts entourés d'un liseré rouge.

b) L'action de fortes concentrations sub-inhibitrices permet de distinguer dans le groupe II deux sous-groupes A et B.

- Le sous-groupe A comprend les antibactériens qui provoquent avec de fortes concentrations sub-inhibitrices l'apparition de formes augmentées de volume où la fluorescence rouge cytoplasmique prédomine. C'est le cas du Chloramphénicol, du groupe des Tétracyclines, de l'Erythromycine et de la Furadoïne.

- Dans le sous-groupe B au contraire, l'augmentation de concentration n'entraîne pas de modifications morphologiques, les bactéries restant toujours de type cocciforme.

Tous les antibiotiques classés dans ce sous-groupe en dehors de l'Adiazine ont comme facteur commun d'altérer la perméabilité de la membrane cytoplasmique en plus de la synthèse des protéines. C'est le cas de la Streptomycine, de la Colimycine et de la Novobiocine.

Les explications et les hypothèses biochimiques soulevées au cours de ce travail demanderont par la suite une confirmation ou une infirmation par les procédés de la Biochimie et de la Spectrophotométrie. Néanmoins, la méthode de fluorescence par l'Acridine orange pourrait trouver une application spectrophotométrique plus précise que la simple étude morphologique globale que nous avons effectuée.

Vu, LE DOYEN :

Pour le Doyen,
L'Assesseur
L. REVOL

LE RECTEUR,

Président
du Conseil de l'Université :
P. LOUIS

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 2 Novembre 1965

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

P^r MONNET

BIBLIOGRAPHIE

L'acridine orange

1. ALBERT A. — The Acridines. Arnold, London, 1951.
2. ANDERSON E.S. — Visual observation of deoxyribonucleic acid. Changes in bacteria during growth of bacteriophage. *Nature*, 1957, 180 : 1336-1338.
3. ANDERSON E.S., ARMSTRONG J.A. et NIVEN J.S.F. — Fluorescence microscopy ; observations of virus growth with amino acridines. *Ninth Symposium of the Society for General Microbiology*. Isaacs A. and Lacey B.W., ed., University Press, Cambridge, 1959.
4. ANDERSON W.A.D. et GUNN S.A. — Cytologic detection of cancer. Considerations for its future : a comparative examination of the Papanicolaou and acridine orange technics. *Acta Cytologica*, 1962, 6 : 468-470.
5. ARMSTRONG J.A. — Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence. *Exptl. Cell Research*, 1956, 11 : 640-643.
6. ARMSTRONG J.A. et NIVEN J.S.F. — Fluorescence microscopy in the study of nucleic acids : histochemical observation on cellular and virus nucleic acid. *Nature*, 1957, 180 : 1335-1336.
7. BEERS R.F. Jr., HENDLEY D.D. et STEINER R.F. — Inhibition and activation of polynucleotides. Phosphorylase through the formation of complexes between acridine orange and polynucleotides. *Nature*, 1958, 182 : 242-244.
8. BEERS R.F. Jr. — Acridine orange binding by *Micrococcus Lysodeikticus*. *J. of Bact.*, 1964, 81 : 1249-1256.
9. BEHRENS W. — Die Scheiden färbung, ein einfaches diagnostisches Hilfsmittel zur Untercheidung infektiöses Hakenwurmlarven von unbescheideten frei lebenden Nematoden und ihren larven. *Z. Tropenmed. Parasito.*, 1955, 6 : 111.

10. BERTALANFFY F.D. — Fluorescence microscope method for detection of pulmonary malignancies. *Can. Med. Assoc. J.*, 1960, 83 : 211-212.
11. BERTALANFFY F.D. — Evaluation of the acridine orange fluorescence microscope method for diagnosis of cancer. *Ann. New-York Acad. Sci.*, 1962, 93 : 715-750.
12. BERTALANFFY L. von et BICKIS I. — Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 1956, 4 : 481-493.
13. BERTALANFFY L. von, MASIN F. et MASIN M. — Use of acridine orange fluorescence technique in exfoliative cytology. *Science*, 1956, 124 : 1024-1025.
14. BERTALANFFY L. von, MASIN F. et MASIN M. — A new rapid method for diagnosis of vaginal and cervical cancer by fluorescence microscopy. *Cancer*, 1958, 11 : 873-887.
15. BETTS A. — The substitution of acridine orange in the periodic-acid-Schiff stain. *American J. Clin. Path.*, 1961, 36 : 240-244.
16. BISHOP M.W.H. et SMILES J. — Induced fluorescence in mammalian gametes with acridine orange. *Nature*, 1957, 179 : 307-308.
17. BISHOP M.W.H. et SMILES J. — Differentiation between living and dead spermatozoa by fluorescence microscopy. *Nature*, 1957, 179 : 308.
18. BOEL E.J. — Dynamics of growth processes. Princeton, 1954, Princeton University Press.
19. BOERNER-PATZELT D. — Ueber ursaechliche Faktoren der polychromen Fluoreszenz von Geweben und Gewebestrukturen nach Fluorochromierung mit nur einem Fluorochrom. *Protoplasma*, 1950, 39 : 639.
20. BOGEN H.G. — Anfärbung, Schädigung und Abtötung von Hefezellen durch Acridinorange. *Arch. Mikrobiol.*, 1953, 18 : 170.
21. BOTAN E.A. et HOVNANIAN H.P. — The detection of extraterrestrial life by means of a quantitative fluorescent nucleic acid-Acridine orange reaction. In : « *Committ. Space. Res. 7th. Plenary. Meetg. and 5th. internation. Space. Sci. Symp. Florence, Italy*, 1964.

22. BOYLE R.E., NELSON S.S., DOLLISH F.R. et OLSEN M.J. — The interaction of deoxyribonucleic acid and acridine orange. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1962, 96 : 47-50.
23. BRADLEY O.F. et FELSENFELD G. — Aggregation of an acridine orange dye on native and denatured deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1959, 184 : 1920-1922.
24. BRADLEY O.F. et WOLF M.K. — Neurochemistry of nucleotides and aminoacids. 89, *John Wiley and Sons, Inc.*, 1960.
25. BRADLEY D.E. — Staining of bacteriophage nucleic acids with acridine orange. *Nature*, 1965, 205 (4977) : 1230.
26. BRENNER S., BARNETT L., CRICK F.H.C. et ORGEL A. — The theory of mutagenesis. *J. Mol. Biol.*, 1961, 3 : 121-122.
27. BRIDGES B.A. et MUNSON R.J. — Comparative counts of bacterial nuclei made visible by four different techniques. *J. Gen. Microbiol.*, 1965 29 (2) : 267-273.
28. BRUMBERG Y.M., BARSKII I.Y., KONDRAT'eva T.M. et CHERNOGRADSKAYA N.A. — Ultrat-violet fluorescence of the formal elements of the bone marrow and peripheral blood of animals and man in normal and pathological conditions : I. — Ultrat-violet fluorescence of the bone marrow and peripheral blood of animals and man in normal conditions. *Biophysics*, 1961, 6 (1) : 121-128 et 6 (5) : 678-685.
29. BUCHERER H. — Experimentelle Untersuchungen über die Fluoreszenzfaerbung toter und lebender Bakterien nach Strugger. *Zbl. Bakteriol.*, 1943, 2 Abt., 106 : 81.
30. BUENO F.L. — Estudio del virus de la vacuna. Antivariolica mediante las tecnicas de tincion con anaranjado de acridina y de immunofluorescencia. *Rev. Sanid. Hig. Publica*, 1964, 38 : 225-243.
31. BUKATSCH H. et HAITINGER M. — Beiträge zur Fluoreszenzmikroskopischen Darstellung des Zellinhaltes, insbesondere des Cytoplasmas und des Zellkerns. *Protoplasma*, 1940, 34 : 515.
32. CHICK E.W. et DURHAM N.C. — Acridine orange fluorescent stain for fungi. *Arch. of Dermatol.*, 1961, 83 : 305-309.
33. CHICK E.W. et BEHAR V.S. — A simple fluorescent method for the detection of superficial fungi in skin and hair. A combined stain with acridine orange and potassium hydroxide. *J. Invest. Dermatol.*, 1961, 37 : 103-105.

34. CLARK R.F. et HENCH M.E. — Practical application of acridine orange in the demonstration of fungi. *Tech. Bull. Registry. Med. Technol.*, 1962, 32 : 19-20.
35. CORSI O.B. et HARKEWITCH. — Infezione da adenovirus di cellule KB ; studio degli acidi nuclei col metodo dell'arancio di acridina. *Ann. Sclavo.*, 1961, 3 : 536.
36. COUDERT J., MICHEL-BRUN J. et AMBROISE-THOMAS P. — Influence des extraits de *T. cruzi* sur les acides nucléiques de la cellule du sarcome d'Ehrlich de la souris. *C.R. Soc. de Biol.*, 1964, 158 : 72.
37. COUDERT J., AMBROISE-THOMAS J., MICHEL-BRUN J. et DESPEIGNES J. — Identification rapide des parasites sanguicoles par l'acridine orange en microfluorescence. *C.R. des Séances de la Soc. de Biol., Lyon, Séance du 15 mars 1965* (à paraître).
38. CRAWTHER D. et MELNICK J.L. — The incorporation of neutral-red and acridine orange into developping Poliovirus particles making them photosensitive. *Virology*, 1961, 14 : 11-21.
39. DANGL F. — Ueber das Verhalten von Acridinfarbstoffen als fluorochrome. *Microchemia*, 1951, 37 : 1163.
40. DARKEN M.A. — Natural and induced fluorescence in microscopic organisms. *Appl. Microbiol.*, 1961, 9 : 354-360.
41. DARKEN M.A. — Absorption and transport of fluorescent brighteners by organisms. *Appl. Microbiol.*, 1962, 10 : 387-393.
42. DE BRUYN P.P.H., ROBERTSON R.C. et FARR R.S. — « In vivo » affinity of diamino acridine for nuclei. *Anat. Record*, 1950, 108 : 279-308.
43. DE BRUYN P.P.H., FARR R.S., BANKS H. et MORTHLAND F.W. — « In vivo » and « in vitro » affinity of diamino-acridines for nucleoproteins. *Exptl. Cell Research*, 1953, 4 : 174-180.
44. DE BRUYN P.P.H. et SMITH N.H. — Comparaison between the « in vivo » and « in vitro » interactions of aminoacridines with nucleic acids and other compounds. *Exptl. Cell Research*, 1958, 17 : 482-489.
45. DEMIKHOUSKIJ E.I. et ROSKVAS O.N. — Particularité de la coloration par fluorescence des spores au repos des bactéries et des actinomyces (traduit du russe). *Antibiotiki*, 1964, 9 : 503-505.
46. DONATH T. et LENGYEL I. — Analysis of the staining properties of acridine orange in epithelial cells. *Acta. Morpho. Acad. Sci. Hungaricae*, 1961, 10 : 21-31.

47. DUIJN (C. Van) Jr. — Effect of acridine orange on living bull spermatozoa. *Nature*, 1960, 187 : 1006-1008.
48. DUIJN (C. Van). — Effects of light and optical sensitization by acridine orange on living bull spermatozoa. *Nature*, 1961, 189 : 76-78.
49. DUTTA G.P. — Demonstration of neutral polysaccharides with fluorescent microscopy using acridine orange. *Nature*, 1965, 205 (4972) : 712.
50. EPHRUSSI B. et HOTTINGER H. — Direct demonstration of the mutagenic action of euflavin on Baker's yeast. *Nature*, 1950, 166 : 956.
51. FADDEEVA M.D. — Spectral characterisation of complexe acridine orange and native, denatured and reactive D.N.A. *Tsitologiya*, 1964, 6 : 241-244.
52. FREIFELDER D. et URETZ R.B. — Inactivation by visible light of yeast sensitized by a nucleic acid fluorochrome. *Nature*, 1960, 186 : 731-732.
53. FRIEDRICH E.G., JULIAN C.G. et WOODRUFF J.O. — Acridine orange in vulva dysplasia. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 1964, 90 : 1281-1287.
54. FURASAWA, EIICHI et CUTTING, WINDSOR. — Histological changes in cells infected with Columbia S.K. Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1960, 103 : 851-854.
55. FURASAWA, EIICHI et CUTTING, WINDSOR. — Detection of viral D.N.A. in inclusion bodies of Ectromelia-infected tumor cells with fluorescence microscopy. *Virology*, 1960, 11 : 632-634.
56. FURMANN G. — Anwendung fluoreszenzmikroskopischer Methoden zum nachweis von Malaria parasiten. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 1962, 13 : 24-29.
57. GAINER J.H. — Demonstration of Anaplasma marginale with the fluorescence dye, acridine orange ; comparison with the complement-fixation test and Wright's stain. *Amer. J. Vet. Res.*, 1961, 22 : 882-886.
58. GARTNER K. — Ein Beitrag zur Färbbarkeit der lebenden und toten Bakterienzelle. Gleichzeitig eine Mitteilung über die Bakterienstruktur und deren chemotherapeutische Beeinflussbarkeit. *Z. Hyg. Infektr.*, 1943, 125 : 86.
59. GÖSSNER W. — Zur Histochemie des Strugger Effekts. *Verh. Dtsch. Ges. Path.*, 1949, 33 : 102.
60. HACKETT A.J. — The photodynamic effects of acridine orange on an R.N.A. (vesicular exantheme). *Photochem. and Photobiol.*, 1962, 1 : 147-154.

61. HATHAWAY W.E., NEWBY L.A. et GITHINS J.H. — The acridine orange viability test applied to born marrow cells. I. — Correlation with trypsin blue and eosin dye exclusion and tissue culture from formation. *Blood J. Hematolog.*, 1964, 23 : 517-527.
62. HICKS J.D. et MATTHAEI C. — A selective fluorescence for mucin. *J. Path. Bact.*, 1958, 75 : 473-476.
63. HILL R.B. Jr., BENSCH K.G. et KING D.W. — Unimpaired mitosis cells with modified deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1959, 184 : 1429-1430.
64. HILL R.B. Jr. et KING D.W. — The effect of acridine orange on L strain fibroblasts. *Federation Proc.*, 1959, 18 : 481.
65. HILL R.B. Jr., BENSCH K.G. et KING D.W. — Photosensitization of nucleic acid and nucleoproteins. The photodynamic action of acridine orange on living cells in culture. *Exptl. Cell Research*, 1960, 21 : 106-117.
66. HÖFLER K. — Zur Vital und Fluoreszenzfaerbung. *Ber. Dtsch. Botan. Ges.*, 1954, 64 : 453.
67. HOOKER W.J. et SUMMANWAR A.S. — Intracellular acridine orange fluorescence in Plant virus infection. *Exptl. Cell Research*, 1964, 33 : 609-612.
68. HUNTER D.T. Jr. et BROWN N. — Morphology of benign cells as observed though the acridine orange fluorescence technic. *Acta. Cytol.*, 1961, 5 : 250-252.
69. KARIAKIN A.V., GLADKOVA M.A. et MILAYEVA M.L. — Comparative investigation of the absorption spectra and fluorescence of the serum of patients with lung cancer and normal individuals. *Biophysics*, 1961, 6 (2) : 268-270.
70. KARREMAN G., MUELLER H. et STENT-GYORGYI A. — Competition binding of A.T.P. and acridine orange by muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1957, 43 : 373-379.
71. KAWASAKI D.M. et WILSON J.H. — The application of rapid acridine orange technique using fluorescence microscopy. *Obstet. and Gynecol.*, 1961, 22 : 636-639.
72. KEEBLE S.A. et JAY R.F. — Fluorescent staining for the differentiation of intracellular Ribonucleic acid. *Nature*, 1962, 193 : 695-696.
73. KLEINWACHTER V. et KOUDELKA J. — Thermal denaturation of deoxyribonucleic acid-acridine orange complexes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1964, 91 : 539-540.

74. KLINGENBERG H.G. et MÜLLER F. — Untersuchungen zur Wirkung von Acridinorange und Protamin auf das Membranpotential der markhaltigen Nervenfasern. *Zeitschr. Biol.*, 1961, 113 : 1-8.
75. KÖNIG H. — Vital staining of lysosomes by acridine orange. In : *3rd Annual meeting of the American Society for Cell Biology*, New-York, 1961. *J. of Cell Biol.*, 1963, 19 : 87 A.
76. KORGONKAR K.S. et SUKHATANKAR J.V. — Antitumor activity of the fluorescent dye, Acridine orange, on Yoshida sarcoma (Ascites). *Brit. J. Cancer*, 1963, 17 : 471-473.
77. KOSSENOV W. et MAI H. — Ueber die Fluoreszenzmikroskopische Blutzellen. *Ztschr. Kinderheilkunde*, 1952, 70 : 552.
78. KREBS A.T. et GIERLACH Z.S. — Vital staining with the fluorochrome acridine orange and its application to radiobiology. I. — Alpha-ray effects. *Amer. J. Roentgenol.*, 1951, 65 : 93.
79. KRIEG A. — Fluoreszenzanalyse und Fluorochromie in Biologie und Medizin. *Klin. Wschr.*, 1953, 31 : 350.
80. KRIEG A. — Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Kernäquivalenten in Bakterien. *Naturwissenschaften*, 1953, 40 : 414.
81. KRIEG A. — Mikroskopische Studien « in vivo » zur Zytologie der Hefezelle. *Experientia*, 1954, 10 : 172.
82. KUSHNICK Th. et CHRISTOS N.J. — Acridine orange fluorescence. A new technique for examination of LCR. *J. Amer. Med. Assoc.*, 1963, 186 : 264-265.
83. ITRI G.B. — The value of the reticulocytes in the healthy man. Comparaison between the results of a method using Acridine orange and a method using brilliant cresyl violet. *Prog. Med.* (Napoli), 1964, 20 : 789-791.
84. JOSHI U.N. et KORGONKAR K.S. — Fluorescence of tissue culture stained with acridine orange. *Nature*, 1959, 183 : 400-401.
85. LAAN (Van der) P.A. et BIJLOO J.D. — Viability test of cyst contents of the potato root eelworm by fluorescent staining with acridine orange. *Tijdschr. Plantenziekten*, 1955, 61 : 69-75.
86. LASNITZKI I. et WILKINSON J.H. — The effect of acridine derivatives on growth and mitosis of cells « in vivo ». *Brit. J. Cancer*, 1948, 2 : 369.

87. LEITH J.D. Jr. — Acridine orange and Acriflavine inhibit deoxyribonucleic action. *Biochem. Biophys. Acta*, 1963, 72 : 643-644.
88. LERMAN L.S. — Structural considerations in the interaction of D.N.A. and acridines. *J. Mol. Biol.*, 1961, 3 : 18-30.
89. LERMAN L.S. — The structure of D.N.A.-Acridine complexe. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 1963, 49 : 94-102.
90. LEVADITI J.C. — Etude comparée de la fluorescence provoquée chez les bactéries par la thioflavine et l'orangé d'acridine. *C.R. de la Soc. Biol., Paris*, 1944, 138 : 136-137.
91. LEVADITI J.C. et AUGIER J. — Variante de la technique de Macchiavello appliquée à la microscopie en fluorescence des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1949, 76 : 184.
92. LOGRIFFO G. et BASINSKI D.H. — The value of acridine orange for sterilizing viruses in plasma and whole blood. *Fed. Proc.*, 1960, 19 (1 pt 1) : 56.
93. Mc FADZEAN J.A. et VALENTINE R.C. — The value of acridine orange and of electron microscopy in determining the viability of *Mycobacterium Leprae* Murinum. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 1959, 53 : 414-422.
94. MARCOWITCH H. — Rapports entre la structure des acridines et leur activité en tant qu'agents inducteurs de mutant respiratoire chez la levure. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1953, 85 : 199-216.
95. MARKS R. et GOODWIN A.M. — Comparative evaluation of acridine orange fluorescence and Papanicolaou methods for cytodiagnosis of cancer. *Brit. J. Cancer*, 1962, 16 : 390-399.
96. MAYOR H.D. et DIWAN A.R. — Studies on viral replication using the fluorochrome acridine orange. In : *8th. Intern. Congress for Microbiol., Montreal, Quebec, Canada*. N° D.26.2, p. 81, 1962.
97. MAYOR H.D. — Biophysical studies on viruses using the fluorochrome acridine orange. *Progr. Med. Virol.*, 1962, 4 : 70-85.
98. MAYOR H.D. — The nucleic acids of viruses as revealed by their reactions with fluorochrome acridine orange. *Intern. Rev. Exptl. Path.*, 1963, 2 : 1-45.
99. MORGAN R.S. et RHOADS D.J. — Binding of acridine orange to yeast ribosomes (SC 43045). *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, 102 (1) : 311.

100. MORTHLAND F.W., DE BRUYN P.P.H. et SMITH N.H. — Spectrophotometric studies on the interaction of nucleic acid with amino-acridines and other basic dyes. *Exptl. Cell Research*, 1954, 7 : 201-214.
101. MURRAY G.W. — Nuclear staining of dermatophytes with the fluorescent dye acridine orange. *J. Invest. Dermatol.*, 1961, 37 : 167-170.
102. NEUTROV V.D., MILIUTIN V.N. et KHANDNEV T.T. — Photomicrography of large virus and Rickettsias under fluorescence microscope. *Problems of Virology*, 1959, 4 : 117-120.
103. NIVEN J.S.F. — Fluorescence microscopy of nucleic acid. Changes in virus-infected cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1959, 81 : 84-88.
104. NIVEN J.S. — Discussion in virus virulence and pathogenicity. G.E.W. Wolstenholme et C.M. O'Conner, Ed., 1960. p. 54-55. *Cuttle Brown and Co, Boston*.
105. ORGEL A. et BRENNERS S. — Mutagenesis of bacteriophages T4 by acridines. *J. Mol. Biol.*, 1961, 3 : 762-768.
106. OSTERHOUT S. — Studies on the interaction of herpes simplex virus and human amnion cell in tissue culture. *Thesis. (The Rockefeller Institute), New-York*, 1959.
107. PALIARD P., VINCENT P., BARTHE J. et Mme MANCHET. — Etude cytologique des épanchements de séreuses par l'acridine orange. *C.R. de la Société Médicale de Lyon*, séance du 5 avril 1965 (à paraître).
108. PAPAGEORGIOU A. — Kritische Bemerkungen zur Akridinorange Fluorochromierung in der zytologischen Krebsdiagnostik. *Med. Welt.*, 1963, 2 : 113-114.
109. PEACOCKE A.R. et SKERRET J.N.H. — The interaction of amino-acridines with nucleic acids. *Trans. Faraday Soc.*, 1956, 52 : 261.
110. PICKETT J.P., BISHOP C.M., CHICK E.W. et BAKER R.D. — A simple fluorescent stain for fungi : selective staining of fungi by a fluorescent method for mucin. *Amer. J. Clin. Path.*, 1960, 34 : 197-202.
111. POLLAR F. et STARR T.J. — Studies of intracellular virus with acridine orange fluorochrome. *Progr. Med. Virol.*, 4 : 54-59, Karger, Basel/New-York, 1962.
112. PROPER R. — Acridine orange fluorescent staining of gastric cytological elements. *Bull. Gastrointestinal Endoscopy*, 1962, 9 : 7-10.

113. RANADIVE N.S. et KORGAONKAR K.S. — Spectrophotometric studies on the binding of acridine orange to ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Acta*, 1960, 39 : 547-550.
114. RENADE S.S., TATAKE V.G. et KORGAONKAR K.S. — Effect of ultrasonic radiation in *Escherichia coli* B using fluorochrome acridine orange as a vital stain. *Nature*, 1961, 189 : 931-932.
115. REPENTIGNY (J. de), SONEA S. et FRAPPIER A. — Etude microfluorométrique des microorganismes. I. La fluorescence primaire (autofluorescence). II. La fluorescence secondaire ajoutée par les fluorochromes. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1961, 101 : 545-558.
116. REPENTIGNY (J. de), SONEA S. et FRAPPIER A. — Modifications macromoléculaires chez une bactérie pathogène au moyen d'antimétabolites des acides nucléiques. Effets comparés du 5-fluorouracile et de l'orangé d'acridine sur les indicateurs de virulence de *Staph. Aureus*. *Rev. Can. Biol.*, 1964, 23 : 233-240.
117. RIEGER R. et ARND M. — Sensitization effects of acridine orange (A.O.) on the radiomimetics activity of nitrogen mustard (HN_2). *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 1962, 7 : 331-335.
118. RIVA H.L. et TURNER T.R. — Fluorescence microscopy in exfoliative cytology. A ten-second acridine orange staining technic for cytologic cancer screening. *Obste. and Gynecol.*, 1962, 20 : 451-457.
119. ROBBINS E. et MARKOS Ph.I. — Dynamic of acridine orange interaction : I. Interrelations of acridine orange particles and cytoplasmic rednings. *J. Cell. Biol.*, 1963, 18 : 237-250.
120. ROME D.S. — Acridine orange vs. Papanicolaou stains in the diagnosis lung cancer. In : G.L. Wied, Editor. *Proceedings of the 1st. Intern. Cong. of exfoliative Cytology*. 1961. J.B. Lippencott Company : Philadelphia 5. Pa. 1962, p. 159-161.
121. ROSCHLAU G. — Unterscheidung verschiedener Neutralfette in histologischen Schnitten durch Fluorochromierung mit Akridinorange und Astraphosphin. *Acta. Biol. Med. Germ.*, 1963, 10 : 687-688.
122. ROTHSTEIN N. — Vital staining of blood parasites with acridine orange. *J. Parasitol.*, 1958, 44 : 588-596.

123. RUDAT (von), K.D. et GRIEM R. — Zur Frage der Infektiosität von gefärbten Tuberkelbakterienpräparaten. (Ein Vergleich zwischen der Ziehl-Nelsen und Akridinorangefärbung. *Mschr. Tbk. Bekpf.*, 1962, 5 : 239-245.
124. RUSTAD R.C. — The induction of mitotic delay by radiation and acridine orange. *Radiation Res.*, 1961, 14 : 496.
125. SARASWATHY R. et SUBRĀMANIAN M.K. — Differential fluorescence of the chromocenter and nuclear equivalents of the yeast nucleus in acridine orange. *Proc. Indian. Acad. Sci., Sect. B*, 1960, 51 : 205.
126. SASTRY K.S. et GORDON M.P. — The influence of metals on the bindings of acridine orange to T.M.V.-R.N.A. In : 47th. *Annual Meeting of the Federation of Amer. Soc. for Exper. Biol.*, 1963, *Fed. Proc.*, 1963, 22 : 582.
127. SASTRY K.S. et GORDON M.P. — The effect of metal ions on the binding of acridine orange to tobacco mosaic virus ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Acta*, 1964, 91 : 406-415.
128. SAUNDERS A.M. — Histochemical identification of acid mucopolysaccharid with acridine orange. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, 12 : 164-170.
129. SAWAI Y., TANAKA H. et YASAKI Y. — Studies vaccina virus by fluorescent microscope. *Jap. J. Exptl. Med.*, 1955, 25 : 71-73.
130. SCARPA B. — Colorazione con fluorocromi di germi vivi e morti. *Ric. Ist. Siero Terapico Ital.*, 1962, 37 : 476-486.
131. SCHIFFER L.M. — Fluorescence microscopy with acridine orange. A study of hemopoietic cells in fixed preparations. *Blood, J. Hematol.*, 1962, 19 : 200-207.
132. SCHULER R. — Die vitale Darstellung der Chromatinstrukturen von « *Bacterium coli* » mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes. *Naturwissenschaften*, 1952, 39 : 90.
133. SCHULER R. — Die vitale Darstellung der Chromatinstrukturen von « *Bacterium coli* » mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes. *Arch. Protistenk.*, 1954, 99 : 227.
134. SCHÜMMELFELDER N., EBSCHNER K.J. et KROGH E. — Die Grundlage der differentiellen Fluorochromierung von Ribo- und Deoxyribonucleinsäure mit Acridinorange. *Naturwissenschaften*, 1957, 17 : 467-468.

135. SHERIF M. — Intravital fluorescence microscopy in the qualitative evaluation of the interaction of acridine orange with nucleic acid in intact living human organ. *Nature*, 1964, 204 : 390-391.
136. SHERIF M. — Structure and role of cytoplasmic ribonucleic acid in malignancy. *Nature*, 1965, 207 (4998) : 772-773.
137. SIMINTZIS G. et THIVOLET J. — Coloration de « Trichomonas foetus » par l'orange d'acridine. *Bull. Soc. Sci. Vétérinaire de Lyon*, 1963, 65 (4) : 207-212.
138. SMILES J. et TAYLOR A.E.R. — Induced fluorescence with acridine orange in Nematode embryology. *Nature*, 1957, 179 : 306-307.
139. STEFFENSEN D.M. — Chromosome structure with special reference to the role of metal ions. VI. Dye binding studies with chromosome and nucleic acids. *Intern. Rev. of Cytology*, 1961, 12 : 182-183.
140. STEINER R.F. et BEERS R.F. Jr. — Spectral changes accompanying binding of acridine orange by polyadenylic acid. *Science*, 1958, 127 : 335.
141. STEINER R.F. et BEERS R.F. Jr. — Polyribonucleotides : V. Titration and spectrophotometric studies upon the interaction of synthetic polynucleotides with various dyes. *Arch. Bioch. Biophys.*, 1959, 81 : 75-92.
142. STRUGGER S. — Fluoreszenzmikroskopische untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Acridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. *Jena. Z. Naturw.*, 1940, 73 : 97-134.
143. STRUGGER S. — Fluorescence microscope examination of bacteria in soil. *Can. J. Research.*, 1948, C. 26 : 188-193.
144. STRUGGER S. — Fluorescence microscope examination of trypanosomes in blood. *Can. J. Research*, 1948, E. 26 : 229-231.
145. STRUGGER S. — Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Hanover : M. et H. Schafer, 1949.
146. SUGAR J. et VIG E. — The effect of nitrogen mustard on the acridine orange uptake of Ehrlich ascites tumor cells. *Acta. Morph. Acad. Sci. Hungaricae*, 1956, 6 : 15-24.
147. TAKAHASHI M. — Fluorescence of fresh and glycerinated muscle stained with acridine orange. *Sapporo Med. J.*, 1962, 21 : 85-89.

148. TCHNAN Y.T. et AUGIER J. — Micromanipulation en fluorescence. Application à l'étude de variation de fluorescence avec l'âge des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1949, 76 : 374-376.
149. TURNER T.R. — Fluorescence photomicrography of acridine orange stained exfoliative cytologic preparations. *J. Biol. Photogr. Assoc.*, 1960, 28 (1) : 9-10.
150. UDENFRIEND S. — Fluorescence assay in Biology and Medecin. *New-York Academic Press, London*, 1962.
151. VALENCIANO L.M. et GALLARDO P. — A preliminary note on the study by means of fluorescent stains of the poliomyelitis virus in cell culture (stained with acridine orange). *Rev. San. a Hig. Publ.*, 1963, 37 : 83-91.
152. VAN NIEKERK W.A. — Acridine orange fluorescence microscopy in the detection of pathogenic vagina flora. *Obst. and Gynecol.*, 1962, 20 : 596-601.
153. VENETTA B.D. et SHURE A.Q. — Adsorption isotherm studies of unfixed S-37-A and Ehrlich ascites tumor cell using acridine orange. *Exptl. Cell. Res.*, 1961, 24 : 570-579.
154. VENTZKE L.E. — Fluorescence microscopy with acridine orange in gastro-intestinal cytology. *Gastro-enterology*, 1962, 45 : 712-717.
155. VINEGAR R. — Metachromatic differential fluorochroming of living and dead ascites tumor cells with acridine orange. *Cancer Res.*, 1956, 16 : 900-906.
156. VINEGAR R. — Staining and injury of ascites tumor cells with the basic fluor acridine orange. *Dissertation Abst.*, 1957, 17 : 953.
157. WANATABE T. et FURASAWA T. — Episomes-mediate transfer of drug-resistance in Enterobacteriaceae. II. Elimination of resistance factors with acridines dyes. *J. of Bact.*, 1961, 81 : 679-683.
158. WEBB R.B. et KUBITSCHKE H.E. — Mutagenic and anti-mutagenic effects of acridine orange in Escherichia coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963, 13 : 90-94.
159. WELLMANN K.F. — Kritische Bemerkungen zur Akridinorange Fluorochromierung in der zytologischen Krebsdiagnostik. *Med. Welt.*, 1962, 40 : 2100-2104.
160. WELLMANN K.F., Mc DERMOTT M.A. et GRAY E.H. — An evaluation of acridine orange microscopy in cytology. *Acta Cytologica*, 1963, 7 : 111-117.

161. WIED G.L. et MANGLANO J.I. — A comparative study of the Papanicolaou technic and the acridine orange fluorescence method. *Acta Cytologica*, 1962, 6 : 554-568.
162. WIMAN L.G. — Exfoliative cytology in oto-laryngology using sulphhydryl activity, A.O. and morphologic staining procedures. *Acta. Oto-Laryng., Stockholm supp.*, 1964, 188 : 261.
163. WOLF M.K. et ARONSON S.B. — Growth, fluorescence and metachromasy of cells cultured in the presence of acridine orange. *J. Histochem. Cytochem.*, 1961, 9 : 22-29.
164. ZANKER V. — Ueber den Nachweis definierter reversibler assoziat (« reversible polymerisate ») des Acridinorange durch Absorption und Fluoreszenzmessungen in waessriger Loesung. *Ztschr., Physik. Chem.*, 1952, 199 : 225.
165. ZEIGER K., HARDERS H. et MÜLLER W. — Der Strugger-Effekt an der Nervenzelle. *Protoplasma*, 1951, 40 : 76.
166. ZELENIN A.V. et LIAPUNOVA E.A. — Inhibition of proteins by acridine orange. *Nature*, 1964, 204 : 45-46.

BIBLIOGRAPHIE

Altérations de la morphologie bactérienne produites par les antibiotiques

1. ALLISON J.L., HARTMAN R.E. et HARTMAN R.S. — Mode of action of chloramphenicol. VII. Growth and multiplication of « *E. coli* » in the presence of chloramphenicol. *J. of Bact.*, 1962, 83 : 609-615.
2. ANAND D. et DAVIS B.D. — Damage by streptomycin to the cell membrane of *Escherichia coli*. *Nature*, 1960, 185 : 22-23.
3. BARBER et GARROD L.F. — Antibiotics and chemotherapy. *E.S. Livingstone L.T.D. Edinburgh, London*, 1963.
4. BERGERSEN F.J. — Cytological changes induced in « *Bacterium coli* » by chloramphenicol. *J. Gen. Microbiol.*, 1953, 9 : 353-356.
5. BRENNER S. — Bacterials protoplasts. *Nature*, 1958, 181 : 1713-1714.
6. BRIGGS S., CRAWFORD K., ABRAHAM E.P. et GLADSTONE G.P. — Some properties of Gram (—) bacilli obtained from a strain of *Staphylococcus aureus* in the presence of Benzylpenicillin. *J. Gen. Microbiol.*, 1957, 16 : 614-627.
7. BROCK T.D. — Studies on the mode of action of novobiocin. *J. of Bact.*, 1956, 72 : 320-323.
8. BROCK T.D. et BROCK M.L. — Effect of novobiocin on permeability of *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 85 : 176-185.
9. BROCK T.D. et BROCK M.L. — Similarity in mode of action of chloramphenicol and erythromycin. *Bioch. Biophys. Acta*, 1959, 33 : 274-275.
10. BROCK T.D. — Chloramphenicol. *Bact. Rev.*, 1961, 25 : 32-49.

11. BROCK T.D. — Effects of magnesium ion deficiency on *Escherichia coli* and possible relation to the mode of action of novobiocin. *J. of Bact.*, 1962, 84 : 679-682.
12. BRZIN B. — Production of bulbous and spheroplast-like cells in *Bacterium Anitratum* under the action of sulfathiazol. *Experientia*, 1963, 19 : 634-635.
13. CAGNIANT D. — Peptides naturels à activité antibiotique. *Biologie Médicale*, 1965, 54 : 331-375.
14. CIAK J. et HAHN F.E. — Concurrent morphological and chemical events in *Staphylococcus* exposed to penicillin. *Science*, 1962, 137 : 982-983.
15. CHANG T.W. et WEINSTEIN L. — Morphological changes in Gram-negative exposed to « Cephalothin ». *J. of Bact.*, 1964, 88 : 1790-1797.
16. CHAPMAN G.B. — Cytological aspects of antimicrobial antibiosis. I. Cytological changes associated with the exposure of *Escherichia coli* to colistin sulfate. *J. of Bact.*, 1962, 84 : 169-179.
17. CHAPMAN G.B. — Cytological aspects of antimicrobial antibiosis. II. Cytological changes associated with the exposure of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus megaterium* to colistin sulfate. *J. of Bact.*, 1962, 84 : 180-185.
18. COHEN S.S. et LICHTENSTEIN J. — The isolation of deoxyribonucleic acid from bacterial extract by precipitation with streptomycin. *J. Biol. Chem.*, 1963, 235 (II) : PC55-PC56.
19. CRAWFORD K. et ABRAHAM E.P. — The synergetic action of Cephalosporin « C » and Benzylpenicillin against a penicillinase-producing strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 1957, 16 : 604.
20. DA SILVA M., ATEIXERA. — A applicacao sa tecnica de Mason e Powelson ao estudo de algumas alteracoes morfologicas induzidas pela penicillina na *Escherichia coli*. *Folia. Anat. Univ. Conimbrigensis. (Coimbra)*, 1962, 36 : 1-8.
21. DELAMATER E.D., HUNTER M.E., SZVYBALSKY W. et BRYSON V. — Chemically induced aberration of mitosis in bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 1955, 12 : 203-212.
22. DE POUX R. — Influence de différents antibiotiques sur la morphologie des *Azotobacter*. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1953, 84 : 641.

23. DIENES L., WEINBERGER H. et MADOFF S. — The transformation Typhoid Bacilli into L forms under various conditions. *J. of Bact.*, 1950, 59 : 755-764.
24. DONY J. — Les Pénicillines : Biosynthèse et méthode d'action. *Brux. Méd.*, 1964, 44 : 889.
25. DUBIN D.T., HANCOCK R. et DAVIS B.D. — The sequence of some effects of streptomycin in « E. coli ». *Bioch. Biophys. Acta*, 1963, 74 : 476-489.
26. DUGUID J.P. — The sensitivity of bacteria to the action of penicillin. *Edinb. Med. J.*, 1946, 53 : 407-412.
27. FARI A. et LAMENSANS A. — Action du sulfamide sur la synthèse des protéines bactériennes. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1961, 100 : 81-92.
28. FLEMING A., VOUREKA A., KRAMER I.R.H. et HUGHES W.H. — The morphology and motility of *Proteus vulgaris* and other organisms cultured in the presence of penicillin. *J. Gen. Microbiol.*, 1950, 4 : 257-269.
29. GALE E.F. — Mechanism of antibiotic action. *Pharmacol. Rev.*, 1963, 15 : 481-530.
30. GARDNER A.D. — Morphological effects of penicillin on bacteria. *Nature*, 1940, 146 : 837.
31. GEBICKI J.M. et JAMES A.M. — Effect of some lytic agents on *Aerobacter aerogenes*. *Nature*, 1958, 182 : 725-726.
32. GEBICKI J.M. et JAMES A.M. — The preparation and properties of spheroplasts of *Aerobacter aerogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 1960, 23 : 9-18.
33. HAHN F.E. et CIAK J. — Penicillin induced lysis of E coli. *Science*, 1957, 125 : 119-120.
34. HAHN F.E., SCHAECHTER M., GEGLOWSKI W.S., HOPPS H.E. et CIAK J. — Interrelations between nucleic acid and protein biosynthesis. I. Synthesis and fate of bacterial nucleic acids during exposure to, and recovery from the action of chloramphenicol. *Bioch. Biophys. Acta*, 1957, 26 : 269.
35. HANCOCK R. — Early effects of streptomycin on « *Bacillus megaterium* ». *J. of Bact.*, 1964, 88 : 633-639.
36. HASH J.H., WISHNICK M. et MILLER P.A. — On the mode of action of tetracyclin in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 1964, 239 : 2070-2078.
37. HILSON G.R.F. et ELECT S.D. — An investigation into the developpement of Gram negative rods in penicillin treated cultures of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 1959, 21 : 208-220.

38. HINES W.D., FREEMAN B.A. et PEARSON G.R. — Production and characterisation of « Brucella » spheroplasts. *J. of Bact.*, 1964, 87 : 438-445.
39. HUGHES W.H. — The inheritance of differences in growth rate in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 1955, 12 : 265-268.
40. HUGHES W.H. — The differences in antibiotic sensitivity of closely related single cell of *Proteus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.*, 1955, 12 : 269-274.
41. HUGO W.B. et RUSSEL A.D. — Quantitative aspects of penicillin action on *E. Coli* in hypertonic medium. *J. of Bact.*, 1960, 80 : 436-440.
42. HUGO W.B. — Penicillin induced round bodies in Gram negative bacteria. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1958, 10 : 590-591.
43. HUGO W.B. et RUSSEL A.D. — Action of penicillin on « *Aerobacter cloacae* ». *J. of Bact.*, 1961, 82 : 411-417.
44. HUGO W.B. et RUSSEL A.D. — The mode of action of penicillin. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1961, 13 : 705-722.
45. HUGO W.B. et RUSSEL A.D. — The effect of temperature on the action of penicillin on « *E. Coli* ». *J. Pharm. Pharmacol.*, 1961, 13 : 688-693.
46. HUGO W.B. et RUSSEL A.D. — The effect of pH on the stability of penicillin induced spheroplasts. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1962, 14 : 256.
47. HURWITZ C., REINER J.M. et LANDAU J.V. — Studies in the physiology and biochemistry of induced spheroplasts of « *Escherichia coli* ». *J. of Bact.*, 1958, 76 : 612-617.
48. HURWITZ C., LANDAU J.V. et DÖPPEL M.W. — Effect of exposure of « *E. Coli* » to streptomycin on ability to undergo cell division. *J. of Bact.*, 1962, 84 : 1116-1117.
49. HURWITZ C. et ROSANO C.L. — Accumulation of label C^{14} streptomycin by *Escherichia Coli*. *J. of Bact.*, 1962, 83 : 1193.
50. HURWITZ C. — Mechanism of action of streptomycin. In *J.C. Sylvester. Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1963, 371.
51. HURWITZ C., DÖPPEL H.W. et ROSANO C.L. — Correlation of the « in vivo » action of streptomycin on survival and on protein synthesis by « *Mycobacterium fortuitum* ». *J. Gen. Microbiol.*, 1964, 35 : 159-167.
52. JUHASZ S.E. — Aberrant forms of *Mycobact. Phlei* produced by streptomycin. *J. Gen. Microbiol.*, 1962, 28 : 9-13.

53. KAGAN B.M., ZOLLA S., BUSSE R. et LIEPNIEKS S. — Sensitivity of « coccal » and L forms of *Staphylococcus aureus* to five antibiotics. *J. of Bact.*, 1964, 88 : 630-632.
54. KAMIJO K. — Morphological studies on the effect of antibiotics on the bacteria cell. V. Morphological changes of *E. coli* by Chloromycetin, Terramycin and Hotycin. *Japan J. of Bact.*, 1954, 9 : 253-257.
55. KAWATA T. et TERUTAKE INOUE. — Spheroidal and polyhedral forms of *Clostridium butyricum* induced by penicillin. *J. of Bact.*, 1963, 86 : 168-170.
56. KAWATA T. et TERUTAKE INOUE. — Spheroplasts formation of *Clostridium* by penicillin and glycine. *Japan J. of Bact.*, 1963, 18 : 354.
57. KAYE J.J. et CHAPMAN G.B. — Cytological aspects of antimicrobial antibiotics. III. Cytologically distinguishable stages in antibiotic action of Colistin sulfate on « *E. Coli* ». *J. of Bact.*, 1963, 86 : 536-543.
58. KELLENBERGER E., RYTER A. et SECHAUD J. — Electron-microscope study of D.N.A.-containing plasms. II. Vegetative and mature phage D.N.A. as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1959, 4 : 671-678.
59. KLIMEK J.W., CAVALLITO C.J. et BAILEY J.H. — Induced resistance of *Staphylococcus aureus* to various antibiotics. *J. of Bact.*, 1948, 55 : 139.
60. KRAWITT E.L. et WARD J.R. — L Phase variants related to antibiotic inhibition of cell wall biosynthesis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, 1963, 114 : 629-631.
61. LAST J.A., KUZUO ISAKI et SNELL J.F. — The failure of Tetracycline to bind to *Escherichia coli* ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, 100 : 532-534.
62. LAMENSANS A. et FARI A. — Croissance linéaire chez « *E. Coli* » soumis à l'action du para-amino-phenyl-sulfamide. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1960, 250 : 226-228.
63. LANDMAN O.E., ALTENBERN R.A. et GINOZA. — Quantitative conversion of cells and protoplasts of *Proteus mirabilis* and *E. Coli* to the L form. *J. of Bact.*, 1958, 75 : 567-576.
64. LARK K.G. — Abnormal growth induced by penicillin in a strain of *Alcaligenes fecalis*. *Can. J. Microbiol.*, 1958, 4 : 165-177.

65. LARK K.G. — Variation during the cell division cycle in the penicillin production of protoplasts-like forms of *Alcaligenes fecalis*. *Can. J. Microbiol.*, 1958, 4 : 179-189.
66. LEDERBERG J. — Bacterial protoplasts induced by penicillin. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, 1956, 42 : 574-577.
67. LEDERBERG J. — Mechanism of action of penicillin. *J. of Bact.*, 1957, 73 : 144.
68. LEDERBERG J. et SAINT-CLAIR J. — Protoplasts and L type growth of *E. Coli*. *J. of Bact.*, 1958, 75 : 143.
69. LEVADITI C. et HENRY J. — Mécanisme de l'activité « in vitro » de la streptomycine sur *E. coli*. *Revue Immunol.*, 1947, 11 : 22-31.
70. LEVADITI C. et HENRY J. — Mise en évidence de modifications morphologiques et tinctoriales des micro-organismes soumis à l'influence des antibiotiques et des bactériophages par la méthode des décalques. *Rev. Immunol.*, 1948, 12 : 193.
71. LEVADITI C., VAISMAN A. et HENRY J. — Contribution à l'étude d'un nouvel antibiotique : la polymyxine (aérosporine). *Rev. Immunol.*, 1949, 13 : 112-127.
72. LIEBERMASTER K. et KELLENBERGER E. — Studien zur L Form der Bakterien. I. Die unwandlung der Bazillären in die Globuläre Zellform bei *Proteus* unter Einfluss von Penicillin. *Z. Naturforsch.*, 1956, 11 b : 200.
73. LOCKWOOD J.S. — Studies on the mechanism of the action of Sulfanilamide. III. The effect of sulfanilamide in serum and blood on Hemolytic Streptococci in vitro. *J. of Immunol.*, 1938, 35 : 155.
74. LURIA S. — Action du Para-aminobenzensulfamide sur le *Bacterium Coli*. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 1939, 131 : 429-432.
75. LWOFF A., NITTI F., TREFOUËL (Mme J.) et HAMON V. — Recherches sur le sulfamide et action de l'antisulfamide. I. Action du sulfamide sur *Polyfomella caeca*. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1941, 67 : 9.
76. MARCHAL J.G. et MARCHAL A. — Modifications morphologiques observées chez *B. Roseus* sous l'action de l'Erythromycine. *Trav. Lab. Microbiol., Nancy*, 1959, 19 : 95-100.

77. MATSUMAE A. et HATA T. — Morphological changes of bacteria induced by chemotherapeutic agents. I. A classification of chemotherapeutic agents based on their activity to induced morphological changes on *Escherichia coli* strain B. *J. of Antibiotics*, 1964, 17 (4) : 164-169.
78. Mc COLLA D.R. — Effects of some nitrofuranes on D.N.A. (Deoxyribonucleic acid) and prophage induction. *Can. J. Microbiol.*, 1964, 42 (8) : 1245-1257.
79. MICHAEL J.G., MASSEL B.F. et PERKINS R.E. — Effect of sublethal concentrations of penicillin on virulence and antigenic composition of group A *Streptococci*. *J. of Bact.*, 1963, 85 : 1280-1287.
80. MURRAY R.G.E., FRANCOMBE W.H. et MAYAL B.H. — The effect of penicillin on the structure of *Staphylococcal* Cell-wall. *Can. J. Microbiol.*, 1959, 5 : 641-648.
81. NEMETH G. et CSIK L. — Effect of penicillin on « *Tetrahymena pyriformis* », strain GL. I. Multiplication and change of forms. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung., Budapest*, 1961, 11 : 405-410.
82. NOZZOLILLO C.G. et HOCHSTER R.M. — Lysis and preparation of stable « protoplasts » of *Xanthomonas phaseoli* (XP8). *Can. J. Microbiol.*, 1959, 5 : 471-478.
83. PAINE T.F. et DANIEL R.R. — Attempts to obtain Gram negative rods from staphylococci treated with penicillin. *J. Gen. Microbiol.*, 1959, 21 : 203-204.
84. PATTE J.C. et CHABBERT Y.A. — Modalités d'action antibactérienne de la colistine. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 1961, *Suppl. au N° du 4 avril* 1961.
85. PRATT R. et DUFRENOY J. — Cytochemical interpretation of the mechanism of penicillin action. *Bact. Rev.*, 1948, 12 : 79-103.
86. PULVERTAFT R.J.V. — The effects of antibiotics on growing culture of *Bacterium coli*. *J. Path. Bact.*, 1952, 64 : 75-89.
87. PULVERTAFT R.J.V. — The L forms of bacteria in relation to antibiotics. *J. Path. Bact.*, 1953, 65 : 175.
88. RATNEY R.S. — The chemistry of the cell wall of *Bacillus anthracis*. The effect of penicillin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1965, 101 : 1-5.
89. ROSENKRANZ H.S. et CARR H.S. — Lethality of streptomycin for alkaline phosphatase constitutive *Escherichia coli*. *J. of Bact.*, 1963, 85 : 751-753.

90. RYBAK L.E. et JARMOLENKO. — Modifications morphologiques des méningocoques sous l'influence de la Sulfodimésine et des antibiotiques observées au microscope électronique. *Antibiotiki*, 1961, 6 : 531-534.
91. SCHAECHTER M. et LAING K.O. — Direct observation of fusion of bacterial nuclei. *J. of Bact.*, 1961, 81 : 667-668.
92. SELIGMAN S.J. et HEWITT W.L. — Kinetics of the action of ampicillin on « *E. coli* ». *J. of Bact.*, 1963, 85 : 1160-1164.
93. SPOTTS C.R. et STANIER R.Y. — The mechanism of streptomycin action on bacteria : a unitary hypothesis. *Nature*, 1961, 192 : 633-634.
94. STEINBERG B. — Modification de la structure interne de *E. coli* B sous l'action d'antibiotiques. *Schweiz. Z. Pathol.*, 1952, 15 : 432.
95. STEMPEH H. et HUTCHINSON W.G. — The formation and development of large bodies in *Proteus vulgaris* OX 19. *J. of Bact.*, 1950, 61 : 322-335.
96. TANAKA K. — Studies on the cytology of « spirillum ». *Sci. Papers Coll. Gen. Educ. Univ., Tokio*, 1961, 11 : 69-82.
97. TOHRU TOKUNAGA et SELLER M.I. — Streptomycin induction of premature lysis of bacteriophage infected *Mycobacteria*. *J. of Bact.*, 1965, 89 (2) : 537-538.
98. TULASNE R., VENDRELY R. et MINCK R. — Noyaux bactériens et streptomycine. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 1948, 142 : 1012.
99. TULASNE R., VENDRELY R. et MINCK R. — Noyaux bactériens et pénicilline. *C.R. Soc. Biol., Paris*, 1948, 142 : 237.
100. TAUBENECK U. — Recherche sur la forme L de *Proteus mirabilis*. I. Les formes géantes provoquées par la pénicilline et leur rôle dans l'apparition des formes L. *Z. Allg. Mikrobiol., Dtsch.*, 1962, 2 : 56-76.
101. TZAGOLOFF H. et UMBREIT W.W. — Influence of streptomycin on nucleotide excretion in *Escherichia coli*. *J. of Bact.*, 1963, 85 : 49-52.
102. VAITUZIS Z. et DEETSCH R.N. — Flagella of *Salmonella typhi* murium spheroplasts. *J. of Bact.*, 1965, 89 (6) : 1586-1593.
103. VOUREKA A. — Induced variations in a penicillin resistant-Staphylococcus. *J. Gen. Microbiol.*, 1952, 6 : 352.

104. WEIBULL C. — The isolation of protoplasts from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J. of Bact.*, 1953, 66 : 695.
105. WILLIAMS R.E.O. — L forms of *staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 1963, 33 : 325.
106. WISHNOW R.M., STROMINGER J.L., BIRGE C.H. et THRENN R.H. — Biochemical effects of novobiocin on « *Staphylococcus aureus* ». *J. of Bact.*, 1965, 89 (4) : 1117-1123.
107. WOOD W.B. et ARCHER G.W. — Mechanism of action of antimicrobial drugs. *Ped. Clin. North Amer.*, 1961, 8 (4) : 969.

TABLE DES MATIERES

	PAGES
INTRODUCTION	11
PREMIÈRE PARTIE : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.	
<i>Chapitre I : La coloration par l'acridine orange :</i>	
I. Propriétés générales de l'acridine orange :	
A. Propriétés physico-chimiques	16
B. Spécificité de l'affinité tinctoriale des acides nucléiques	17
C. Toxicité cellulaire de l'acridine orange ...	22
D. Propriétés pharmacodynamiques	23
II. Application de la coloration par l'acridine orange en biologie :	
A. En Histocytologie	24
B. En Microbiologie	26
<i>Chapitre II : Altérations de la morphologie bactérienne produites par les antibiotiques :</i>	
I. Variation de la taille	33
II. Variation de la morphologie	35
III. Variation de l'affinité tinctoriale	37
IV. Variation de la structure interne	37
V. Action sur la reproduction bactérienne	41
DEUXIÈME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL.	
<i>Chapitre I : Technique de coloration par l'acridine orange</i>	
	45
<i>Planche couleur</i>	48 ^{bis}
<i>Chapitre II : Application de la technique par l'acridine orange à l'étude des micro-organismes normaux</i>	
	49
<i>Chapitre III : Application de la technique de coloration par l'acridine orange à l'étude des micro-organismes soumis à l'action d'antibiotiques</i>	
	53

<i>Chapitre IV : Application aux mycobactéries</i>	65
<i>Chapitre V : Discussion</i>	69
I. Valeur de la méthode utilisée : données fournies par l'étude des micro-organismes normaux ..	69
II. Analyse des résultats obtenus avec les anti- biotiques	71
III. Perspectives de la coloration par l'acridine orange en Bactériologie	73
CONCLUSIONS	83
BIBLIOGRAPHIES	87
I. Acridine orange	87
II. Antibiotiques	101

